

NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR):

**Untersuchungen zu einem „Schlüsselenzym“ der
Chlorophyll-Biosynthese in Angiospermen**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München**

**vorgelegt von
Harald Klement
aus München**

27. Oktober 2000

- 1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger**
- 2. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Dittrich**

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Januar 2001

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Phytochemie des Botanischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. W. Rüdiger angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. W. Rüdiger ganz herzlich für das Vertrauen, das er in mich als Lebensmittelchemiker gesetzt hat und es mir so ermöglichte, ein interessantes Thema zu bearbeiten, das Biologie und Chemie verbindet. Viele hilfreiche Diskussionen und Ratschläge und nicht zuletzt sein stetes Interesse haben diese Arbeit von Anfang an begleitet.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Laborleiterin Frau Dr. Ulrike Oster. Sie hat mich sorgfältig in die protein-chemische Analytik eingeführt und zu dem Gelingen dieser Dissertation mit vielen nützlichen Tips maßgeblich beigetragen. Während meiner Arbeit in ihrem Labor konnte ich nicht nur fachlich, sondern auch menschlich sehr viel von ihr lernen. Ihre Geduld und Hilfsbereitschaft sowie der Rückhalt, den sie mir und den anderen Mitarbeitern des Labors immer gegeben hat, machten es für mich einfach auch Rückschläge leicht wegstecken zu können.

Mein herzlicher Dank gilt ferner:

- ☺ Herrn Dr. Michael Helfrich für die Bereitstellung einer Reihe von Pigmenten und die lange und gute Zusammenarbeit. Wir haben es wirklich geschafft während zahlreicher nächtlicher Versuchsreihen - trotz grünem Sicherheitslicht - nie vor dem Spektrophotometer einzuschlafen.
- ☺ All meinen Mitstreitern im Labor Oster für das tolle Arbeitsklima und insbesondere:
 - Herrn K. Mayer, für den Zugriff auf seinen schier unerschöpflichen Vorrat an Kugelschreibern, Bleistiften etc.
 - Frau H. Schmid, für die Geduld und den Humor mit der sie die Diskussionen zum Thema Fußball ertragen hat.
 - Frau I. Blos, für ihren Humor und ihr immer freundliches Wesen, das wir alle vermisst haben, nachdem sie in den wohlverdienten Ruhestand ging.
 - Frau Dr. K. Nikulina und den Diplomanden Herrn A. Beck und Frau J. Kögel, die den Laboralltag angenehm bereichert haben.
- ☺ Herrn Dr. A. Pazur und Herrn H. Schießl für die stetige Bereitschaft mir bei technischen Fragen und Problemen zur Seite zu stehen.
- ☺ Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für die unterschiedlichsten Hilfestellungen, insbesondere:
 - ... Frau Dr. S. Schoch, Frau Dr. V. Scheumann, Herrn PD Dr. L.A. Eichacker, Herrn Prof. Dr. H. Scheer, Herrn Prof. Dr. G. Wanner und Frau H. Snigula.
 - ... sowie Herrn Dr. J. Winkler und Herrn M. Urziger (MPI Martinsried) und Herrn Dr. E. Cmiel (TU Garching).
- ☺ Meiner Mutter und meinem Vater, der diese Arbeit leider nicht miterleben durfte, und meiner Tante G. Klement bin ich dankbar für den Rückhalt und die Unterstützung, auf die ich jederzeit zählen konnte.

...und meiner Frau für die unendliche Geduld und das Verständnis, mit der sie diese Arbeit begleitet hat. Danke liebe Elham.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

Scheumann V., Klement H., Helfrich M., Oster U., Schoch S. und Rüdiger W. (1999):
Protochlorophyllide *b* does not occur in barley etioplasts.
FEBS Letters **445** (2), 445-448

Rüdiger W., Klement H., Helfrich M., Tanaka A., Schoch S. und Oster U. (1999):
Redox reactions in the last steps of chlorophyll biosynthesis.
in „The chloroplast: From molecular biology to biotechnology“.
(Eds. Argyroudi-Akoyunoglou J.H. und Senger H.), 185-190 (Kluwer Academic
Publishers, Holland)

Klement H., Helfrich M., Oster U., Schoch S. und Rüdiger W. (1999):
Pigment-free NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase from *Avena sativa* L.
Purification and substrate specificity.
Eur. J. Biochem. **265**, 862-874

Klement H., Oster U. und Rüdiger W. (2000):
The influence of glycerol and chloroplast lipids on the spectral shifts of pigments
associated with NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase from *Avena sativa* L.
FEBS Lett. **480**, 306-310

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Biosynthese von Chlorophyll <i>a</i>	3
1.2	Die Bedeutung von Licht als Regulationsfaktor	7
1.3	NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR) Charakterisierung des „Schlüsselenzyms“ in Angiospermen	7
1.4	Problemstellung	9
2	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1	Allgemeines	11
2.1.1	Chemikalien.....	11
2.1.2	Geräte.....	11
2.1.3	Organismen.....	12
2.2	Plastidenisolierung	13
2.2.1	Pflanzenanzucht.....	13
2.2.2	Isolierung von Etioplasten	13
2.2.3	Bestimmung der Etioplastenkonzentration.....	16
2.2.4	Elektronenmikroskopische Analyse von Etioplasten (durchgeführt von Prof. Dr. G. Wanner)	16
2.3	Aufreinigung pigmentfreier POR aus Etioplasten	17
2.3.1	Differentielle Solubilisierung - Ultrazentrifugationsschritte	17
2.3.2	Chromatographische Reinigung	18
2.3.3	Pigment-Konzentrationsbestimmung	19
2.4	Überexpression der POR in <i>E.coli</i> und Proteinaufreinigung	20
2.4.1	Überexpressionsbedingungen	20
2.4.2	Proteinaufreinigung	21
2.5	Proteinanalytik	23
2.5.1	Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford.....	23
2.5.2	Elektrophorese und qualitativer Nachweis der POR	24
2.5.2.1	SDS-Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	24
2.5.2.2	Qualitativer Nachweis der POR.....	25
2.5.2.3	Färbung der Polyacrylamidgele	26
2.5.2.4	Densitometrische Auswertung.....	26

2.6	Herstellung und Charakterisierung exogener Pigmente	27
2.6.1	Herstellung.....	27
2.6.2	UV/Vis und MS Daten	29
2.6.3	Bestimmung von Extinktionskoeffizienten	31
2.6.4	Bestimmung der relativen Fluoreszenzquantenausbeute von substratanalogen Pigmenten der POR im Vergleich zu Pchlid <i>a</i>	31
2.7	Isolierung und Analytik von Lipiden aus Etioplasten	32
2.7.1	Extraktion der Lipide aus Etioplasten.....	32
2.7.2	Chromatographische Reinigung	32
2.7.3	Dünnschichtchromatographische qualitative Analyse.....	33
2.7.4	Herstellung von Lipid-Pigment-Gemischen für enzymatische Tests.....	33
2.8	Enzymatische Tests	34
2.8.1	Bestimmung der spezifischen Aktivität in der Aufreinigung der POR aus Hafer	34
2.8.2	Untersuchungen zur Substratspezifität der POR und zur Kinetik der Reaktion.....	35
2.8.2.1	Substratspezifität	35
2.8.2.1.1	UV/Vis-spektroskopische Analyse	35
2.8.2.1.2	HPLC-Analyse.....	35
2.8.2.2	Hemmung der Photoreduktion.....	36
2.8.2.2.1	Hemmung durch Substratüberschuß - Bestimmung des Substratoptimums	36
2.8.2.2.2	Bestimmung der K_M - und v_{max} -Werte für Pchlid <i>a</i> und Pchlid <i>b</i> ...	36
2.8.2.2.3	Bestimmung des K_M - und v_{max} -Wertes für Pchlid <i>a</i> in Anwesenheit von Chl <i>c₁</i>	36
2.8.3	Untersuchungen zum spektralen Verlauf der Photoreduktion.....	37
2.8.3.1	Der Verlauf in Abhängigkeit von der Glycerinkonzentration	37
2.8.3.2	Rekonstitutionsversuch - Untersuchung des Lipideinflusses auf die Photoumwandlung.....	38
2.8.3.3	Tieftemperatur-Fluoreszenzmessungen zur Energieübertragung zwischen endogenen Pigmenten in 80 % Glycerin.....	38
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	39
3.1	Isolierung pigmentfreier POR aus Pflanzenmaterial	39
3.1.1	Aufreinigung.....	39
3.1.1.1	Etioplasten Isolierung	39
3.1.1.2	Aufreinigung der POR durch differentielle Solubilisierung und Ultrazentrifugation.....	41
3.1.1.2.1	Erster Ultrazentrifugationsschritt.....	42
3.1.1.2.2	Zweiter Ultrazentrifugationsschritt.....	43
3.1.1.2.3	Dritter Ultrazentrifugationsschritt	45

3.1.1.3	Chromatographische Reinigung der POR unter Abtrennung der Pigmente	46
3.1.1.3.1	Chromatographie	46
3.1.1.3.2	Vergleich der pigmentfreien POR aus Hafer und Gerste.....	47
3.1.1.3.3	Aktivität der pigmentfrei aufgereinigten POR.....	47
3.1.1.4	Vergleich zwischen Coomassie-, Silber- und Antikörperfärbung	48
3.1.2	Bestimmung des molaren Verhältnisses von Enzym zu Substrat in Etioplasten	49
3.1.2.1	Protein- und Pchlide <i>a</i> -Konzentrationen in den Fraktionen der Aufreinigung.....	50
3.1.2.1.1	Proteinverteilung.....	50
3.1.2.1.2	Pchlide <i>a</i> Verteilung	51
3.1.2.1.3	Verhältnis von Pchlide <i>a</i> zu Protein in den Fraktionen der Aufreinigung.....	52
3.1.2.2	Densitometrische Bestimmung des Anteils an POR in den Aufreinigungsfractionen.....	53
3.1.2.2.1	Relativer Gehalt an POR im Verhältnis zum Gesamtprotein	53
3.1.2.2.2	Absolute Mengen an POR (mg) im Verlauf der Aufreinigung und Berechnung der Ausbeute.....	55
3.1.2.2.3	Ergebnisse zum molaren Verhältnis zwischen Substrat und Enzym	56
3.1.3	Spezifische Aktivität der POR im Verlauf der Aufreinigung.....	56
3.1.4	Diskussion	59
3.2	Untersuchungen zur Substratspezifität der POR.....	65
3.2.1	Charakterisierung der verwendeten Pigmente	66
3.2.1.1	Strukturformeln	66
3.2.1.2	Extinktionskoeffizienten in Lösungsmittel und in wäßrigem Milieu.....	68
3.2.1.3	Relative Fluoreszenzquantenausbeute ausgewählter Pigmente im Vergleich zu Pchlide <i>a</i>	69
3.2.2	Enzymtestbedingungen zur Substratspezifität und zur Kinetik der Photoreduktion	70
3.2.2.1	Cofaktoren	70
3.2.2.2	Lichtsättigung	70
3.2.2.3	Substratoptimum.....	71
3.2.3	Enzymatische Tests zur Substratspezifität.....	72
3.2.3.1	UV/Vis-Spektroskopie.....	72
3.2.3.2	HPLC-Untersuchungen.....	75
3.2.4	Kinetik der Photoreduktion	77
3.2.4.1	Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit.....	78
3.2.4.2	Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante für Pchlide <i>a</i> und Pchlide <i>b</i>	79
3.2.5	Hemmung der Photoreduktion durch nicht photoreduzierbare Pigmente	81
3.2.6	Diskussion	82

3.3	Untersuchungen zu den spektralen Verschiebungen vor, während und nach der Photoreduktion	88
3.3.1	Die Etioplastenfraction „ET“	89
3.3.1.1	Der spektrale Verlauf in 30 % Glycerin	89
3.3.1.2	Der spektrale Verlauf in 80 % Glycerin	91
3.3.2	Die Fraktion „Ü3“	94
3.3.2.1	Der spektrale Verlauf in 30 % Glycerin	94
3.3.2.2	Der spektrale Verlauf in 80 % Glycerin	96
3.3.2.2.1	UV/Vis-Spektroskopie	96
3.3.2.2.2	Tieftemperatur-Fluoreszenzmessungen	100
3.3.2.3	Der spektrale Verlauf nach längerer Probenlagerung ohne NADPH in 30 % Glycerin	101
3.3.3	Die Fraktion „EL“ - Spektrale Verschiebungen in der Fraktion „MBP-POR“	103
3.3.3.1	Ergebnisse der Lipidisolierung	103
3.3.3.2	Der spektrale Verlauf in 30 % Glycerin nach Lipidzusatz	105
3.3.3.3	Der spektrale Verlauf in 80 % Glycerin nach Lipidzusatz	107
3.3.4	Der Einfluß von Lipiden auf die spektralen Verschiebungen der Photoreduktion durch überexprimierte MBP-POR	110
3.3.4.1	Ergebnisse der Überexpression und Proteinaufreinigung von MBP-POR in <i>E.coli</i>	111
3.3.4.2	Der spektrale Verlauf in 30 % Glycerin ohne Lipidzusatz	113
3.3.4.3	Der spektrale Verlauf in 30 % Glycerin nach Lipidzusatz	113
3.3.4.4	Der spektrale Verlauf in 80 % Glycerin nach Lipidzusatz	115
3.3.4.5	Verhalten von MBP-POR gegenüber Pigmentaggregaten	118
3.3.5	Diskussion	119
3.3.5.1	Modellvorstellungen zu den molekularen Ursachen der Pchlid <i>a</i> Formen	120
3.3.5.2	Spektrale Formen in solubilisierten Etioplasten	122
3.3.5.3	Spektrale Formen in der Fraktion Ü3	126
3.3.5.4	<i>In vitro</i> Rekonstitution der spektralen Formen aus der Fraktion EL und rekombinanter POR (MBP-POR)	127
4	ZUSAMMENFASSUNG	135
5	LITERATURVERZEICHNIS	137

ABKÜRZUNGEN

ALA	5-Aminolävulinsäure
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
cDNS	Reverses Transkript der Boten-RNS (mRNS) in DNS
Chl <i>a</i>	Chlorophyll <i>a</i>
Chlide <i>a</i>	Chlorophyllid <i>a</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
DDQ	2,3-Dichlor-4,5-dicyano-benzochinon
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
DEAE	Diethylaminoethyl (Anionenaustauschermaterial)
DGDG	Digalaktosyldiacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,81 m s ⁻²)
<i>h</i>	Stunde(n)
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-Ethansulfonsäure
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
HPTLC	Hochauflösende Dünnschichtchromatographie
kDa	Kilodalton
M	Molarität (mol l ⁻¹)
mA	Milliampere
min	Minute(n)
Mg	Magnesium
MGDG	Monogalaktosyldiacylglycerin
MS	Massenspektrometrie
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
OG	n-Octyl-β-D-Glucosid
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelgelelektrophorese
Pchlide	Protochlorophyllid
Pheide	Pheophorbid
PLB	Prolamellarkörper („prolamellar body“)
POR	NADPH:Protochlorophyllide-Oxidoreduktase
Protopheide	Protopheophorbid
RP	„Reversed Phase“ (mit langkettigen Aliphaten beschichtetes Kieselgel)
RT	Raumtemperatur
<i>s</i>	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
TCA	Trichloressigsäure
Upm	Umdrehungen pro Minute
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
v/v	Volumen / Volumen

Abkürzungen

vol	Volumen
w/v	Gewicht / Volumen
Zn	Zink

1 EINLEITUNG

Die oxygene Photosynthese ist der wichtigste biochemische Vorgang für das Leben auf der Erde. Algen und höhere Pflanzen nehmen dabei die Energie des Sonnenlichtes mit Hilfe von Chlorophyllen auf, wandeln diese in chemisch gebundene Energie um und setzen Sauerstoff frei.

Der Aufbau der sauerstoffhaltigen Erdatmosphäre war der oxygenen Photosynthese der Cyanobakterien (Blaualgen) zu verdanken. Eine der wichtigsten Primärproduzenten am Anfang der Nahrungskette stellt heute das Phytoplankton der Ozeane dar. Es ist wesentlich am Aufbau der Biomasse beteiligt und leistet zudem einen unschätzbaren wichtigen Beitrag zum Weltklima, indem es Kohlendioxid dauerhaft der Erdatmosphäre entzieht.

Das wichtigste Pigment der Cyanobakterien und Algen, sowie der höheren Pflanzen ist Chlorophyll *a*. Es absorbiert vorwiegend blaues und rotes Licht, während grünes Licht großteils wieder zurückgestrahlt wird.

In dem SeaWiFS-Projekt der NASA wird vom Weltraum aus seit 1997 anhand von Absorptionsmessungen das Phytoplankton der Ozeane über den Chlorophyll *a* Gehalt quantifiziert. Die Verbreitung der Vegetation auf den Kontinenten wird durch Infrarotsensoren erfasst. Wie in der Abbildung 01 gezeigt, kann aus den so gewonnenen Daten die Biosphäre der Erde dargestellt werden.

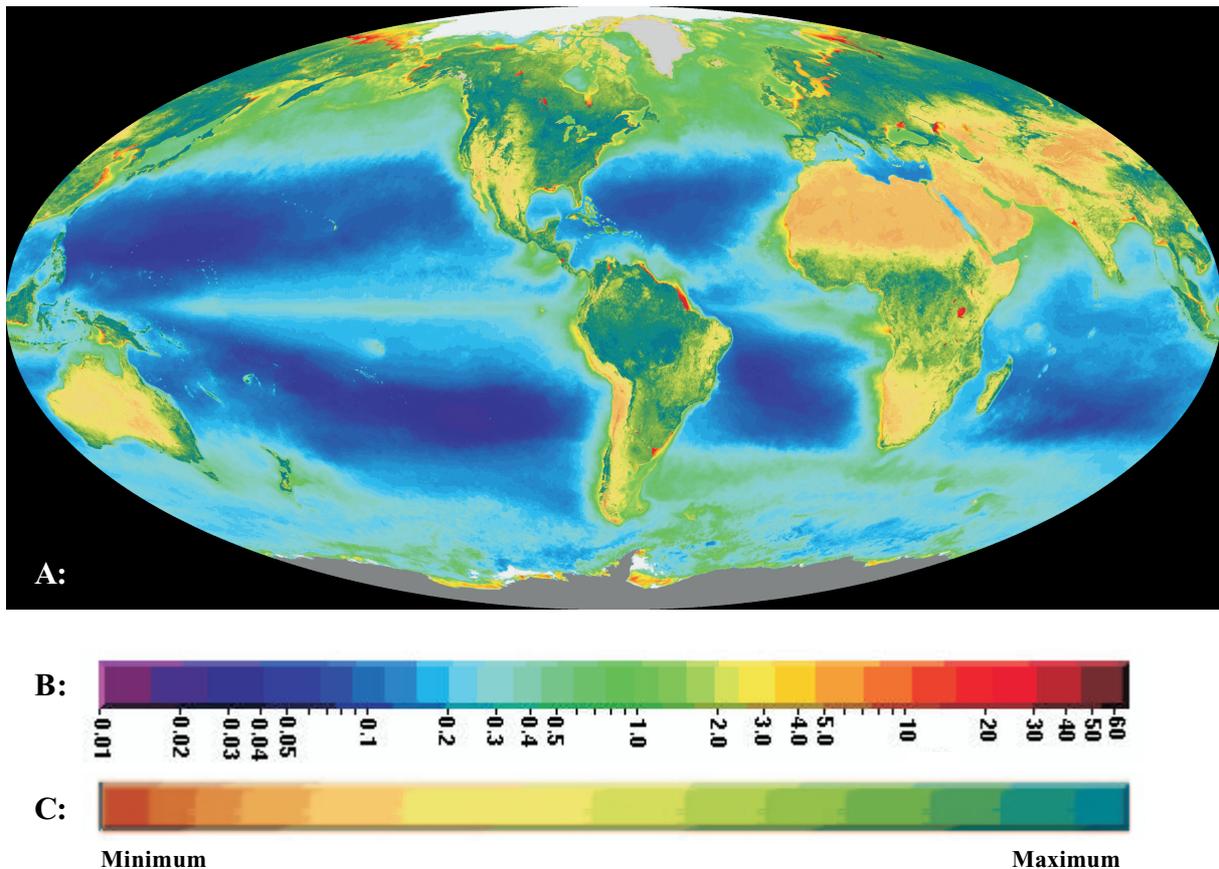


Abb. 01: Die Biosphäre der Erde [entnommen von <http://seawifs.gsfc.nasa.gov/SEAWIFS.html>]
 A: Die Darstellung der Biosphäre beruht auf den gesammelten Daten von September 1997 bis April 2000.
 B: Farbskala zur Quantifizierung des Gehaltes an Chlorophyll *a* in den Ozeanen.
 Die Konzentrationen sind in mg Chlorophyll *a* pro m³ Wasser angegeben.
 C: Farbskala zur Verteilung der kontinentalen Vegetation.

Die Datenflut aus dem All lieferte unbestritten wertvolle Ergebnisse für die Ökologie und die Klimaforschung. Die Biosynthese von Chlorophyll *a* konnte jedoch nur anhand von Untersuchungen im Labor erfolgen.

Der Biosyntheseweg verläuft in mehreren enzymatisch katalysierten Schritten, die im nachfolgenden Kapitel 1.1 in einer Übersicht beschrieben werden.

Ein wichtiger Schritt, die Reduktion des Intermediates Protochlorophyllid *a* (Pchlid *a*) zu Chlorophyllid *a* (Chlid *a*), kann in den meisten Gymnospermen, Farnen, Moosen, Algen und Cyanobakterien durch zwei verschiedene Enzyme katalysiert werden. Es handelt sich hierbei um die NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase, deren katalytische Aktivität obligat lichtabhängig ist, und die lichtunabhängige Protochlorophyllid-Reduktase.

Angiospermen steht für die Katalyse dieses Reaktionsschrittes nur das lichtabhängige Enzym zur Verfügung. Es wird daher in diesen Pflanzen als „Schlüsselenzym“ der Biosynthese von Chlorophyll *a* angesehen. Die vorliegende Arbeit stellt die durchgeführten Untersuchungen zu diesem wichtigen Enzym vor.

1.1 Die Biosynthese von Chlorophyll *a*

Die Biosynthese von Chlorophyll *a* (Chl *a*) [Übersichtsartikel: Beale 1999, Porra 1997, Suzuki *et al.* 1997] läßt sich in drei wichtige Abschnitte unterteilen.

In dem ersten Abschnitt (Abb. 02) wird 5-Aminolevulinsäure (ALA) als erster spezifischer Vorläufer der Porphyrine gebildet.

In Tieren, Hefen, Pilzen und innerhalb der α -Gruppe phototropher Bakterien [Übersichtsartikel: Avissar & Moberg 1995] erfolgt dessen Synthese über den **Shemin-Weg**. Hier reagiert ein Glycin-Pyridoxalphosphat-Schiff'sche-Base-Komplex mit Succinyl-CoA [Warren *et al.* 1994]. Die unter CoA- und CO₂-Abspaltung verlaufende Reaktion wird von der ALA-Synthase [Gibson *et al.* 1958, Kikuchi *et al.* 1958] katalysiert.

In Pflanzen, Algen und allen Bakterien, die nicht der α -Gruppe phototropher Bakterien angehören, wird ALA über den **C₅-Weg** in drei enzymatisch katalysierten Schritten synthetisiert.

Im ersten Schritt aktiviert eine ATP und tRNA^{Glu} abhängige Ligase (1) die C₁ Carboxyl-Gruppe von Glutamat unter Bildung von Glutamyl-1-tRNA [Kannangara *et al.* 1984]. Die Ligase befindet sich zusammen mit einer NADPH abhängigen Reduktase (2) in einem Enzym-Komplex [Jahn 1992]. Letztgenanntes Enzym reduziert die C₁ Carboxyl-Gruppe des aktivierten Glutamat unter Abspaltung der tRNA zu Glutamat-1-semialdehyd (GSA) [Houen *et al.* 1983, Pontoppidan & Kannangara 1994]. Im letzten Schritt entsteht ALA bei der Transaminierung des GSA durch eine Pyridoxamin-5'-phosphat abhängige Transaminase (3) [Kannangara & Gough 1978].

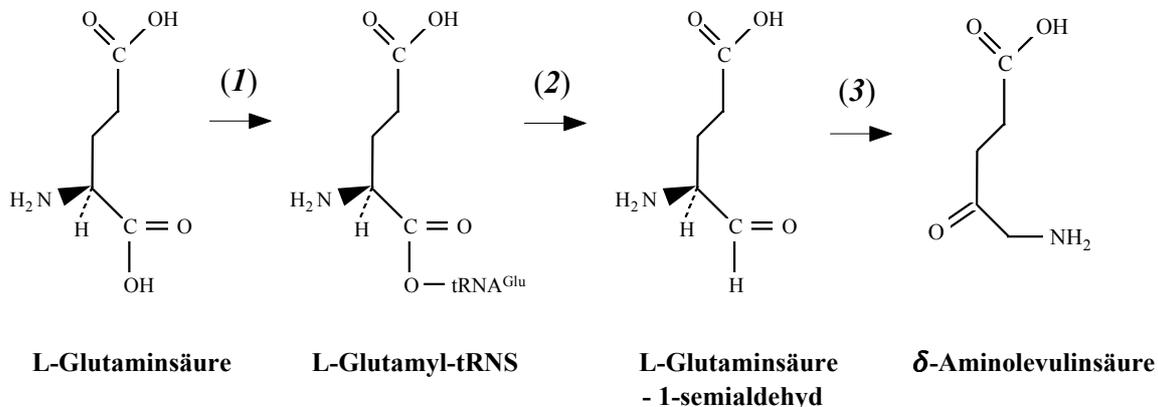


Abb. 02: Erster Abschnitt der Chlorophyll *a*-Biosynthese (C₅-Weg)

Die numerierten Reaktionen werden von folgenden Enzymen katalysiert:

(1) Glutamyl-tRNS-Synthetase, (2) Glutamyl-tRNS-Reduktase; (3) Glutamyl-1-semialdehyd-Aminotransferase

Aus ALA entsteht im zweiten Abschnitt (Abb. 03) über sechs weitere enzymatische Schritte Protoporphyrin IX. Diese Schritte unterscheiden sich in Tieren und Pflanzen nicht.

Zunächst kondensieren zwei Moleküle ALA (unter Eliminierung von zwei Wassermolekülen) zu dem Monopyrrol Porphobilinogen (PBG). Diese Reaktion wird durch eine Zn²⁺ oder Mg²⁺ abhängige Dehydratase katalysiert [Jordan 1991, Spencer & Jordan 1994]. In dem folgenden Reaktionszyklus bildet eine Desaminase aus zwei Molekülen PBG zunächst ihren eigenen Cofaktor. Schrittweise entsteht aus diesem PBG-Dimer ein Hexamer, aus dem letztendlich hydrolytisch Hydroxymethylbilan I, ein lineares Tetrapyrrol, abgespalten wird [Jordan 1994]. Der folgende Ringschluß und eine Isomerisierung des Ringes D wird durch eine Synthase katalysiert [Leeper 1994]. In Bakterien geht von dem hierbei entstandenen Produkt

Uroporphyrinogen III die Synthese von Sirohäm und Vitamin B₁₂ aus. Die Porphyrinsynthese wird mit der Modifikation der Seitenketten weitergeführt. Ausgehend von dem Ring D werden im Uhrzeigersinn durch eine Decarboxylase die Acetat-Gruppen zu Methyl-Gruppen decarboxyliert [Akhtar 1991, Akhtar 1994]. Das Produkt dieser Reaktionen, Coproporphyrinogen III, wird nun an den Propionsäure-Seitenketten der Ringe A und B, in dieser Reihenfolge, modifiziert. Eine Oxidase katalysiert dabei die Carboxylierung und es entsteht Protoporphyrinogen IX mit zwei Vinyl-Gruppen am Ring A und B [Cavaleiro *et al.* 1974]. In der abschließenden, durch eine Oxidase katalysierten Oxidation, führt die Einführung des Systems der konjugierten Doppelbindungen zu Protoporphyrin IX [Jacobs & Jacobs 1984].

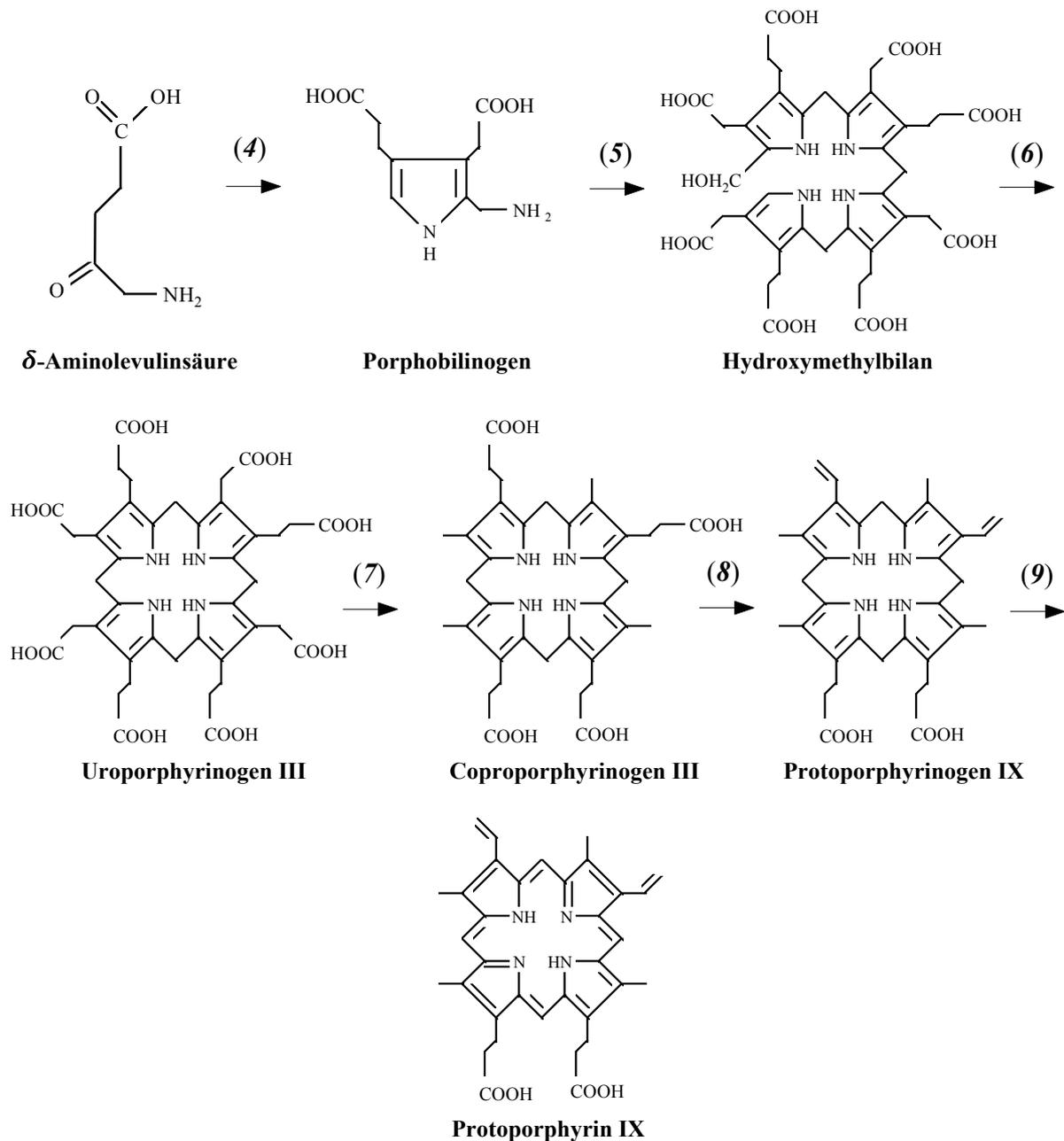


Abb. 03: Zweiter Abschnitt der Chlorophyll *a*-Biosynthese

Die nummerierten Reaktionen werden von folgenden Enzymen katalysiert: (4) Porphobilinogen-Synthase, (5) Hydroxymethylbilan-Synthase; (6) Uroporphyrinogen III-Synthase; (7) Uroporphyrinogen III-Carboxylase; (8) Coproporphyrinogen III-oxidative Decarboxylase; (9) Protoporphyrinogen IX-Oxidase.

Von Protoporphyrin IX gehen zwei Biosynthesewege aus.

In dem **Eisen-Weg** entsteht in Gegenwart von Fe^{2+} -Ionen, katalysiert durch die Fe-Chelatase, Protohäm IX [Matringe *et al.* 1994]. Dieses bildet die prosthetische Gruppe von Hämoglobin, Myoglobin, Katalasen, Peroxidasen und Cytochrom *b* und ist außerdem ein Intermediat bei der Synthese von Phycobilin. Letzteres ist der Chromophor der Phycobiliproteine und des Phytochroms.

Der **Magnesium-Weg** führt im letzten Abschnitt (Abb. 04) der Chl *a*-Biosynthese in Pflanzen, über sechs enzymatische Schritte, zur Bildung von Chl *a*. Die von der ATP und Mg^{2+} abhängigen und aus drei Untereinheiten aufgebauten Mg-Chelatase katalysierte Insertion des Mg, führt zu dem ersten Intermediat, Mg-Protoporphyrin IX [Fuesler *et al.* 1984, Gibson *et al.* 1995]. Bei der folgenden Methylierung der Propionsäure-Seitenkette am Ring D über eine *S*-Adenosyl-L-methionin-abhängige Methyltransferase entsteht ein Mg-Protoporphyrin IX Monomethylester [Ellsworth *et al.* 1974, Yee *et al.* 1989]. Ein Sauerstoff und NADPH abhängiges Cyclase-System katalysiert in der Folge die Bildung des isozyklischen Ringes E [Nasrulhaq-Boyce *et al.* 1987, Whyte & Castelfranco 1993].

Die 8-Vinyl-Gruppe des hier entstandenen Produktes [3,8-Divinyl]-protochlorophyllid *a* wird von einer Reduktase zur Ethyl-Gruppe hydriert. Es bildet sich [3-Vinyl,8-ethyl]-protochlorophyllid *a* (Pchlid *a*). Rebeiz *et al.* [1983] vermuten, daß diese Reduktase an verschiedenen Punkten der Chl *a*-Biosynthese angreifen kann. Die Substratspezifität könnte von Protoporphyrinogen IX bis Chlorophyllid *a* (Chlid *a*), dem letzten Intermediat der Biosynthese, reichen. Ebenso kann die Existenz verschiedener 8-Vinyl-Reduktasen nicht ausgeschlossen werden [Porra 1997]. Die meisten in der Natur vorkommenden Chlorophylle tragen am Ring B diese Ethyl-Gruppe („monovinyl Chl“), manche sind jedoch nicht reduziert („divinyl Chl“). Das Verhältnis zwischen beiden Formen scheint von der Pflanzenart und den Lichtbedingungen während des Wachstums abzuhängen [Richards *et al.* 1987].

Die folgende Reduktion von Pchlid *a* zu Chlid *a*, die über die Hydrierung einer Doppelbindung am Ring D verläuft, wird als „Schlüsselreaktion“ der Chl *a*-Biosynthese bezeichnet [Übersichtsartikel: Fujita 1996, Lebedev & Timko 1998]. In allen Organismen, mit Ausnahme von Bakteriochlorophyll (Bchl) haltigen Proteobakterien sowie von Angiospermen, kann diese Reaktion lichtabhängig oder lichtunabhängig ablaufen.

An der noch wenig erforschten lichtunabhängigen Katalyse sind drei Untereinheiten (ChlB, ChlL und ChlN) der Reduktase beteiligt [Übersichtsartikel: Timko 1998]. In Bchl-haltigen Proteobakterien scheint nur diese Reaktion möglich zu sein [Suzuki & Bauer 1995]. Ein einzelnes Enzym, die NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (EC 1.3.1.33, abgekürzt POR) katalysiert die lichtabhängige Reaktion. In Angiospermen ist nur die POR vorhanden, sodaß die Reduktion von Pchlid *a* ausschließlich lichtabhängig erfolgt. Bevor auf diese Besonderheit näher eingegangen wird, zunächst noch einige Anmerkungen zu dem letzten Schritt der Chl *a*-Biosynthese.

Chlid *a* wird unter Katalyse der Chlorophyll-Synthase zu Chl *a* verestert [Rüdiger *et al.* 1980]. Die Reaktion an der Propionsäure-Seitenkette am Ring D erfolgt mit Komponenten aus dem Isoprenoid-Stoffwechsel. Bei im Dunkeln gewachsenen Pflanzen, erfolgt nach der ersten Belichtung die Veresterung bevorzugt mit Digeranylpyrophosphat [Schoch *et al.* 1977, Schoch 1978]. In grünen Pflanzen bevorzugt das Enzym Phytylpyrophosphat als Substrat [Soll *et al.* 1983, Rüdiger 1987]. Der abschließende, sofortige Einbau des synthetisierten Chl's über Chl bindende Proteine in die Thylakoide ist gekoppelt an die Entwicklung der Chloroplasten und den Aufbau des Photosynthese-Apparates [Mullet 1988].

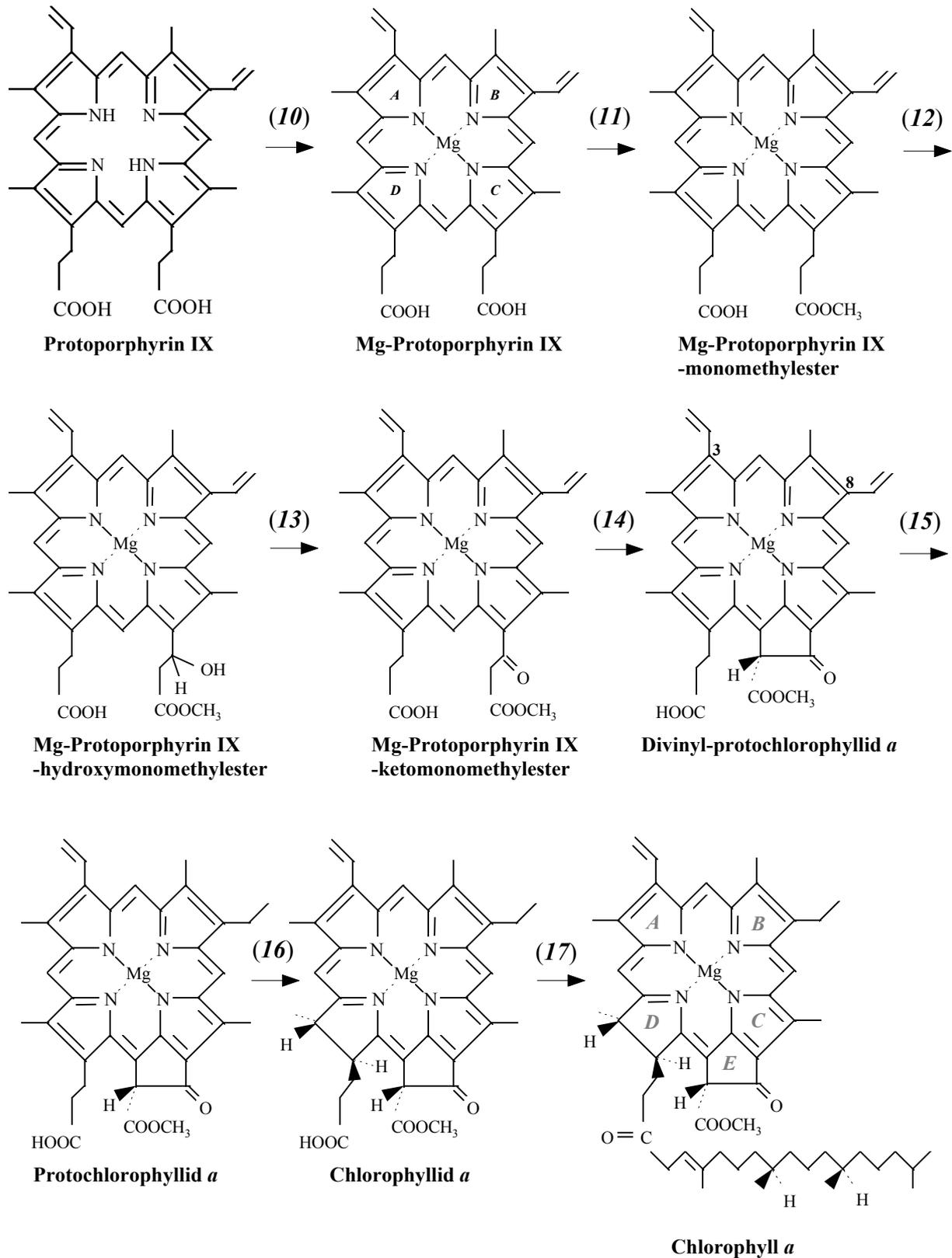


Abb. 04: Dritter Abschnitt der Chlorophyll *a*-Biosynthese (*Mg*-Weg).

Die nummerierten Reaktionen werden von folgenden Enzymen katalysiert:

(10) Protoporphyrin IX-Mg-Chelatase; (11) S-Adenosyl-L-methionin:Mg-Protoporphyrin IX-Methyltransferase;

(12-14) Mg-Protoporphyrin IX-monomethylester-oxidative Cyclase;

(15) Divinyl-protochlorophyllid-4-Vinyl-Reduktase; (16) Lichtunabhängige Protochlorophyllid-Reduktase oder lichtabhängige NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase; (17) Chlorophyll-Synthase.

1.2 Die Bedeutung von Licht als Regulationsfaktor

Einer der bedeutendsten Faktoren für die Regulation der Chl *a*-Biosynthese [Übersichtsartikel: Reinbothe & Reinbothe 1996 b] ist das Licht. Dabei muß zwischen direkten und indirekten Einflüssen unterschieden werden.

Indirekt wirkt Licht induzierend auf die Transkription einiger beteiligter Enyme. In höheren Pflanzen wird bei der Synthese von ALA die Regulation über den Photorezeptor Phytochrom diskutiert [Huang *et al.* 1989]. Darüber hinaus vermuten Masuda *et al.* [1996] eine Aktivierung der ALA-Synthese durch Lichtstimulation der Glutamyl-1-tRNS-Reduktase.

In der Natur sind bisher nur zwei Enzyme bekannt, deren katalytische Aktivität direkt durch Licht hervorgerufen wird. Ein Enzym ist die DNA-Photolyase. Es ist an der Reparatur von UV-Licht geschädigten DNS Molekülen beteiligt [Begley 1994].

Das andere Enzym, die NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR), gilt als „Schlüsselenzym der Chl *a*-Biosynthese“ [Townley *et al.* 1998] in Angiospermen. Sie besitzen für die Reduktion des Intermediates Pchlid *a* ausschließlich dieses obligat lichtabhängige Enzym. Bei einem Wachstum in der Dunkelheit (Etiolierung) kann daher kein Chl *a* gebildet werden und folgerichtig entstehen in solchen Pflanzen auch keine zur Photosynthese befähigten Plastiden (Chloroplasten).

Die bei der Etiolierung während der Skotomorphogenese entwickelten Plastiden (Etioplasten) zeigen zwei, miteinander in Kontakt stehende, innere Membransysteme. Es handelt sich dabei einerseits um nicht gestapelte, perforierte Prothylakoidmembranen (PT's) und andererseits um parakristalline Prolamellarkörper (PLB's). Die POR bildet zusammen dem Substrat Pchlid *a* und NADPH als ternärer Komplex [Griffiths 1978] den hauptsächlichsten Proteinanteil in den PLB's [Lindsten *et al.* 1988, Ryberg & Sundqvist 1991]. Nach der Belichtung erfolgt während der Photomorphogenese die Umwandlung von Etioplasten zu Chloroplasten. Dabei wird die PLB-Struktur aufgelöst und es entstehen Thylakoidmembranen [Henningsen & Boynton 1970].

Die herausragende Stellung der POR bei der Chl *a*-Biosynthese in Angiospermen beruht nicht nur auf der absoluten Lichtabhängigkeit für die katalytische Aktivität, sondern ist nach Armstrong *et al.* [2000] auch in der Beteiligung an dem Auf- und Umbau dieser Membransysteme zu sehen.

1.3 NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR)

Charakterisierung des „Schlüsselenzyms“ in Angiospermen

Die POR ist ein kerncodiertes Polypeptid [Spano *et al.* 1992 a,b]. Die Synthese erfolgt als Vorstufenprotein, das gegenüber der POR in Etioplasten eine N-terminale Verlängerung zeigt. Diese fungiert als Transitprotein für den posttranslationalen Einbau in die Plastiden. In Übereinstimmung mit den, aus Vollängen-cDNS abgeleiteten Aminosäuresequenzen [Suzuki & Bauer 1995], variiert das Molekulargewicht der aus Etioplasten isolierten POR zwischen 33 und 38 kDa. Aus dem Datenbankabgleich der Aminosäuresequenzen geht hervor, daß die POR der Großfamilie der NADPH akzeptierenden Oxidoreduktasen und kurzkettigen Dehydrogenasen (SDR-Familie) angehört [Baker 1994, Labesse *et al.* 1994, Jörnval *et al.* 1995, Wilks & Timko 1995].

In Gerste [Holthorf *et al.* 1995] und *Arabidopsis thaliana* [Armstrong *et al.* 1995] wurden zwei unterschiedlich codierte isomere Proteine, PORA und PORB entdeckt, deren Aminosäuresequenzen hohe Homologien (über 75%) zeigen. Während in Hafer bisher nur PORA nachgewiesen werden konnte, fanden Oosawa *et al.* [2000] kürzlich in *Arabidopsis thaliana* sogar ein zusätzliches, drittes Gen für eine PORC, die jedoch nicht in der etiolierten Pflanze exprimiert wird.

Reinbothe *et al.* [1995 c] gehen davon aus, daß der Import der Vorstufenproteine in die Plastiden für pPORA von der Anwesenheit von Pchl *a* abhängt, während pPORB unabhängig von einer Bindung zum Substrat importiert werden kann. Dahlin *et al.* [2000] sehen hingegen für beide Vorstufenproteine keine Abhängigkeit des Imports von Pchl *a*.

PORA ist das bei weitem vorherrschende Protein in den Etioplasten. Bei Beginn der Belichtung ist daher in erster Linie PORA für die Reduktion großer Mengen von Pchl *a* verantwortlich. Während des fortschreitenden Ergrünens wird ihre Transkription bald eingestellt [Holthorf *et al.* 1995] und das Enzym selektiv durch eine lichtinduzierte Chloroplasten-Protease [Reinbothe *et al.* 1995a] abgebaut. Die PORB, deren mRNS weitgehend stabil bleibt [Holthorf & Apel 1996], ist verantwortlich für die Bildung der restlichen Chlorophylle und die Bereitstellung von zusätzlichem Chlorophyll während der Photosynthese.

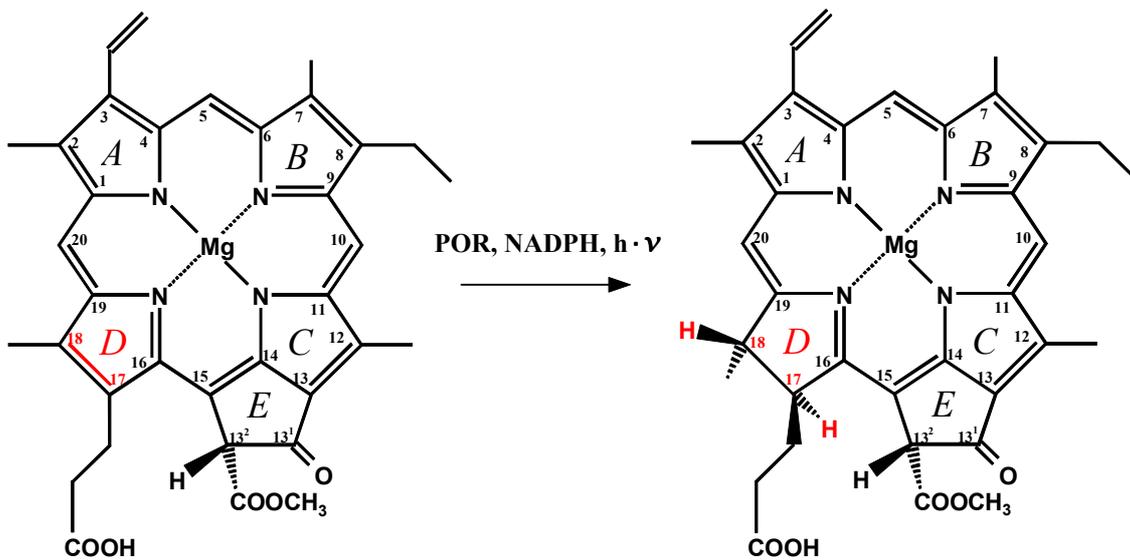


Abb. 05: Stereospezifische *trans*-Reduktion von Protochlorophyllid *a* zu Chlorophyllid *a*, katalysiert durch die lichtabhängige NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase.

Die von der POR katalysierte Reaktion (Abb. 05) verläuft als stereospezifische *trans*-Reduktion der Doppelbindung zwischen C_{17} und C_{18} am Ring D des Pchl *a*. Nur die $13^2(R)$ -Konfiguration des Pigments wird als Substrat akzeptiert [Helfrich *et al.* 1996]. Der Elektronendonator für die Reaktion ist NADPH. Von dessen *pro-S*-Seite wird ein Hydrid auf die C_{17} Position des Pchl *a* übertragen [Valera *et al.* 1987, Begley & Young 1989]. Die Protonierung der C_{18} Position erfolgt durch Wasser oder über einen sauren Aminosäurerest im aktiven Zentrum des Enzyms [Wilks & Timko 1995].

Bisherige Untersuchungen zur Substratspezifität der POR haben ergeben, daß das Zentralatom eine wichtige Rolle bei der Bindung des Pigments an die POR spielt [Griffiths 1980]. Vergleichbar mit der Situation in der POR wird dabei von Helfrich und Rüdiger [1992] für die Chlorophyll-Synthase ein 5-fach koordinierter Metallkomplex vorgeschlagen. Pigmente mit verschiedenen Modifikationen an den Seitenketten der Ringe D und E [Griffiths 1980, Helfrich *et al.* 1996] wurden von der POR bislang nicht akzeptiert, während eine veränderte

Seitenkette des Ringes B zu einem photokonvertierbaren Substrat führte [Schoch *et al.* 1995]. Modifikationen an den Seitenketten des Ringes A wurden bisher nicht untersucht, so daß eindeutige Rückschlüsse auf die Lage des Pchlids *a* in der Bindungstasche noch nicht gezogen werden können.

Die Photoreduktion von Pchlid *a* zu Chlid *a* benötigt nur ein einzelnes Photon [Griffiths *et al.* 1996] und ist spektroskopisch aufgrund der unterschiedlichen Absorptions- und Emissionsmaxima von Edukt und Produkt gut zu verfolgen. Ein dabei auftretendes, nicht fluoreszierendes und sehr kurzlebige Intermediat wurde erstmals von Franck & Mathis [1980] beschrieben. Dessen Struktur ist jedoch bisher nicht bekannt.

In vivo tritt Pchlid *a* in zwei photoaktiven spektralen Formen auf. Die Absorptionsmaxima liegen bei 638 nm und 650 nm [Übersichtsartikel: Griffiths 1991]. Das bei Belichtung entstehende Chlid *a* zeigt zuerst ein Absorptionsmaximum bei 678 nm [Gassman *et al.* 1968], daß sich jedoch schnell langwellig nach 684 nm verschiebt [Oliver & Griffiths 1982]. Binnen 10 bis 60 min folgt eine weitere Verschiebung (Shibata-Shift) von 684 nm auf 672 nm [Shibata 1957].

Der molekulare Hintergrund der unterschiedlichen Wellenlängen und Verschiebungen konnte bis heute nicht eindeutig aufgeklärt werden. Die verschiedenen Absorptionsmaxima von Pchlid *a* werden auf unterschiedlich stark aggregierte ternäre Komplexe zurückgeführt [Böddi *et al.* 1989, Böddi *et al.* 1991]. Es wird vermutet, daß der Aggregationszustand bei der Belichtung erhalten bleibt und somit auch unterschiedlich absorbierende Produkte entstehen [Böddi *et al.* 1990]. Die Shibata-Shift erklären die Autoren mit der Disaggregation der Komplexe. Oliver & Griffiths [1982] sehen die Ursache der Shibata-Shift in der Loslösung des Chlids *a* aus dem ternären Komplex, nachdem NADP⁺ durch NADPH ersetzt wurde. Unklarheit besteht in der Frage nach der kleinsten funktionellen Einheit der ternären Komplexe. Im Allgemeinen wird die POR als Monomer gesehen [Übersichtsartikel: Griffiths 1991], es gibt aber auch Hinweise, daß sie stabile Dimere bilden kann [Martin *et al.* 1997, Chahdi *et al.* 1998].

Die bisherigen Untersuchungen zur Substratspezifität der POR, sowie viele Versuche zu den unterschiedlichen Wellenlängen und Verschiebungen der Absorptionsmaxima von Pchlid *a* und Chlid *a*, wurden an isolierten Etioplasten durchgeführt. Trotz zahlreicher Bemühungen, unter anderem von Apel *et al.* [1980], Beer & Griffiths [1981], Richards *et al.* [1987] und Birve *et al.* [1996] konnte aus Etioplasten bis heute keine enzymatisch aktive POR in pigmentfreier Form zur Homogenität gereinigt werden.

1.4 Problemstellung

Trotz großer Fortschritte im Verständnis über die Rolle der POR bei der Chl *a*-Biosynthese sind bis heute einige fundamentale Fragen nicht ausreichend beantwortet. Dies betrifft einerseits den genauen Mechanismus der Katalyse, andererseits die Wechselwirkung der POR mit den Membranstrukturen in Etioplasten. Die Beteiligung des Enzyms an deren strukturellem Aufbau, beziehungsweise der Einfluß der Lipidumgebung auf den Ablauf der Photoumwandlung sind weitgehend unklar.

Um die Klärung dieser Fragen zu ermöglichen soll die POR zunächst zur Homogenität aufgereinigt werden. Als Voraussetzung für die weiteren Untersuchungen ist es gefordert, dabei nicht nur die volle Aktivität der POR zu erhalten, sondern auch die Abtrennung aller Pigmente (Pchlid *a* und Carotinoide) und Lipide zu ermöglichen.

Im Zuge dieser Aufreinigung soll die Aussage von Apel *et al.* [1980], daß in Etioplasten 2-3 Moleküle Pchlide *a* an ein POR-Molekül gebunden sind, über eine detaillierte Quantifizierung der Pchlide *a* und POR Gehalte überprüft werden.

Bezüglich des katalytischen Mechanismus der POR wurde von Wilks & Timko [1995] ein Modell erstellt, das auf Ergebnissen aus Mutagenesestudien beruht. Zu dessen Aufklärung tragen aber auch Substratspezifitätsstudien bei, die bisher jedoch nur an vorbelichteten Etioplastenmembranen in Gegenwart endogener Pigmente durchgeführt werden konnten [Griffiths 1974, Griffiths 1980, Schoch *et al.* 1995, Helfrich *et al.* 1996]. In enzymatischen Tests mit der pigmentfrei aufzureinigenden POR sollen hier weitere, neue Substratanaloga eingesetzt werden um diejenigen Seitenketten oder Strukturen zu ermitteln, die für die Bindung an das aktive Zentrum der POR und die katalytische Umsetzung wichtig sind.

Bei der Photoreduktion selbst treten *in vivo* für die endogenen Pigmente unterschiedliche spektrale Formen und Verschiebungen der Absorptionsmaxima auf. Es soll eine Methode entwickelt werden, diese auch mit zur Homogenität aufgereinigter POR darzustellen. Die Photoumwandlung soll dabei unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses der Lipidumgebung untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Allgemeines

2.1.1 Chemikalien

Alle eingesetzten Chemikalien sind analysenrein.

Lösungsmittel

Vor Gebrauch destilliert werden: Aceton, Methanol, Ether.
In p.A.-Qualität verwendet werden: Petrolether, Dichlormethan, Chloroform, Hexan, Ethylacetat, Ethanol.

Detergenzien

OG Biomol
Triton-X-100 Boehringer
SDS Serva

Enzyme

TEV-Protease, Rekombinant GibcoBRL®

Material für die Säulen- und Dünnschichtchromatographie

Säulenchromatographie:

DEAE Cellulose Sigma
DEAE 52 Cellulose Whatman
Amylose New England BioLabs
Kieselgel 60, 0,015-0,040 mm Merck

Dünnschichtchromatographie:

Kieselgel 60 F₂₅₄ HPTLC Merck

2.1.2 Geräte

HPLC-System

Pumpe, Controller und in-line degasser: 600E, Waters
UV/Vis-Dioden-Array-Spektrophotometer: Tidas, J&M
Fluoreszenz-Detektor: RF-551, Shimadzu
Software: SpectraChrom Version 1.5, LabControl

Säulen für den präparativen Einsatz:

- 300 × 19 mm, µBondapak™ C-18,
125 Å, 10 µm; Waters
- 300 × 19 mm, Polyethylen
gepackt von Dr. M. Helfrich

Säulen für den analytischen Einsatz:

- 250 × 4,6 mm, Rosil C-18, 5 µm, Grom
- 250 × 4,6 mm, Polyethylen
gepackt von Dr. M. Helfrich

UV/Vis-Spektroskopie

Zweistrahlenspektrophotometer:	UV 2401 PC, Shimadzu
Software:	Spectacle, LabControl
Dioden-Array-Spektrophotometer:	8451 A, Hewlett Packard

Fluoreszenz-Spektroskopie

Fluorimeter:	Spex Fluorolog 221, Jobin Yvon Instruments S.A.
Detektion:	Photomultiplier R 374 (300-800 nm), Hamamatsu
Software:	geschrieben von Dr. A. Pazur

Massenspektroskopie

HPLC:	HP 1100
Massenspektrometer:	Finnigan LCQ

Zentrifugation

Ultrazentrifuge:	2330 Ultraspinn, LKB, Bromma Rotoren: RPS 55T-2-151 RPS 40T-767
Kühlzentrifugen:	RC-5B, Sorvall® Rotoren: GS-3 Festwinkelrotor, Sorvall® HB4 Ausschwingrotor, Beckmann Centrikon H-401, Kontron-Hermle Rotoren: A 6.9, Kontron-Hermle A 6.14, Kontron-Hermle
Tischzentrifugen:	Eppendorf 5415 Hettich 2041

Mikroskopie

Photomikroskop:	Leitz
-----------------	-------

Elektrophorese

Elektrophoresekammer:	Renner
Semidry-Blotapparatur:	TE 70 Semiphor, Hoefer Scientific Instruments

Sonstige Geräte

Kaltlichtlampe mit Lichtleiter:	KL 2500 electronic, Schott
Blitzlicht:	45-CT-1, Metz
Lichtmeßgerät:	LI-COR (LI-189), Bachofer
Ultrathurax:	PT 10-35, Kinematika AG
Sonifier:	GM 70 HD, Bachofer

2.1.3 Organismen

Hafer

Avena sativa L., Stamm „Irlbach“, ungebeizt, BayWa

Gerste

Hordeum vulgare L., Sommergerste, Stamm „Steffi“, Saatzucht Dr. Ackermann & Co.

E. coli

Stamm ER 2508, New England BioLabs

2.2 Plastidenisolierung

2.2.1 Pflanzenanzucht

Hafer und Gerste

Die Aussaat erfolgt in einer PVC-Schale mit den Maßen $54,5 \times 37,0 \times 11,5$ cm. Sie wird zunächst mit 6 l Vermiculith (Körnungsstufe 2, Fa. Grolman, Düsseldorf) gefüllt und dieses nachfolgend mit Leitungswasser im Verhältnis 1/1 (v/v) stark angefeuchtet. Karyopsen im Gesamtgewicht von 680 g werden auf diese Schicht gleichmäßig verteilt, sanft angedrückt und abschließend mit einer ca. 0,5 cm hohen Lage Vermiculith bedeckt. Die Anzucht der etiolierten Keimlinge erfolgt bei 26 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 82 % in einem lichtundurchlässigen Brutschrank mit Luftumwälzung. Die Primärblätter durchstoßen die Koleoptile und wachsen bei Hafer nach 8 Tagen, bei Gerste nach 6 Tagen auf eine Länge von durchschnittlich 12 cm heran. Zu diesen Zeitpunkten werden sie für die Isolierung der Plastiden herangezogen.

2.2.2 Isolierung von Etioplasten

Die Isolierung beruht, unter leichten Modifizierungen, auf der Methode nach Eichacker *et al.* [1996].

Allgemeine Arbeitsbedingungen

Alle Arbeitsschritte werden unter grünem Sicherheitslicht ($<10 \text{ nmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 515-560 nm) durchgeführt. Sämtlich zu verwendende Materialien und Lösungen werden bei 0 °C zunächst vorgekühlt und während der Isolierung auf Eis gehalten.

Isolierung von Etioplasten

Die Abbildung 06 gibt eine Übersicht zu der Isolierung intakter Etioplasten.

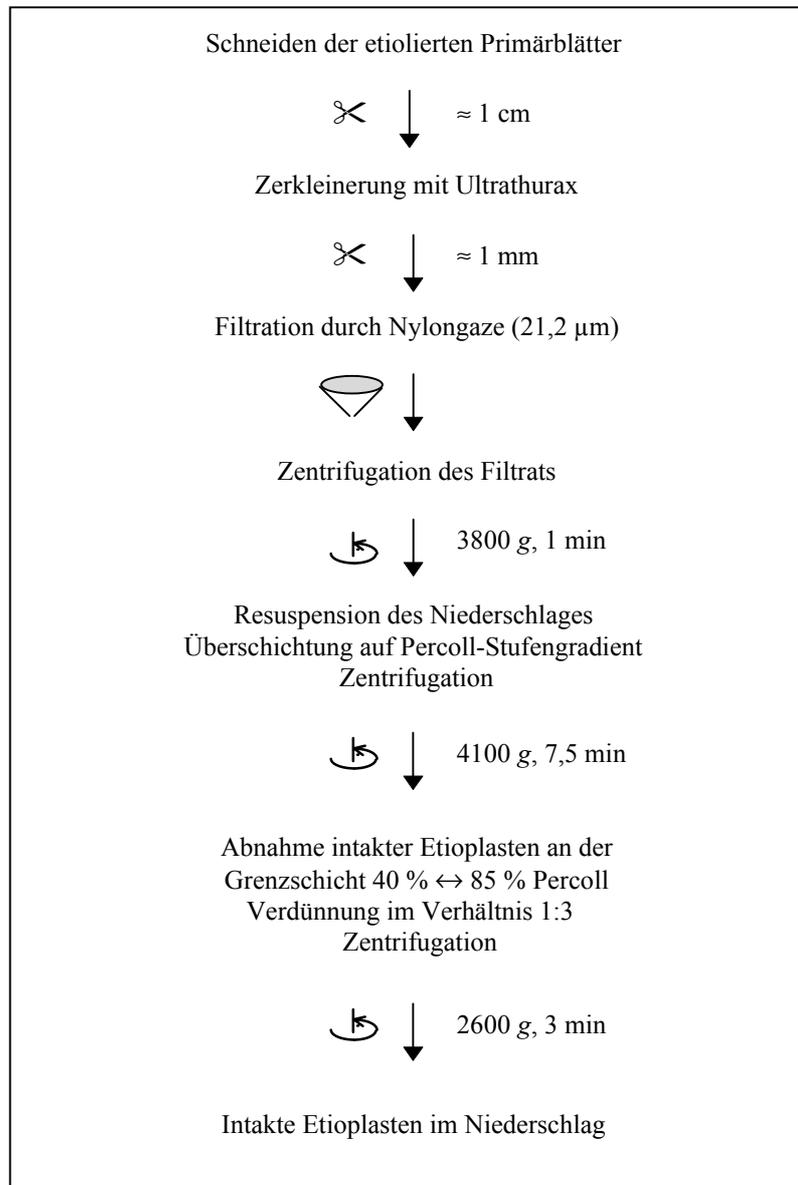


Abb. 06: Vereinfachtes Schema zur Isolierung von Etioplasten

Die etiolierten Primärblätter einer Anzucht von zwei Schalen (siehe 2.2.1) werden 1 cm über dem Boden abgeschnitten, gesammelt und das Frischgewicht bestimmt. Für die Gewinnung der Etioplasten wird ein Frischgewicht von 660 g eingesetzt. Das Blattmaterial wird mit einer Schere in circa 1 cm lange Stücke geschnitten und auf drei Chargen zu je 220 g in jeweils 600 ml Isolationsmedium aufgeteilt. Nochmals wird mit einer Schere versucht eventuell verbliebene größere Blattsegmente zu zerkleinern.

Isolationsmedium:

Hepes/KOH, pH 8,0	50 mM
D-Sorbit	333 mM
Na ₂ -EDTA	2 mM

Für den Zellaufschluß verwendet man einen über die Drehzahl regulierbaren Ultrathurax. Für einen Zeitraum von 5 min wird bei niedriger Drehzahl, mit Unterbrechungen von 5 s, jeweils 3 s lang in Bruchstücke kleiner als 1 mm² zerkleinert. Das Homogenisat wird unter leichtem Auspressen über vier Lagen Baumwollgaze und eine Lage Nylongaze (Porengröße 21,2 µm, Fa. Hepflinger, München) filtriert. Das vereinigte Filtrat mit einem Volumen von 2,3 l wird auf fünf 500 ml Polyethylen-Zentrifugenbecher (Nalgene) gleichmäßig verteilt und für eine Minute bei 3800 g zentrifugiert (GS-3 Rotor, 4 °C). Die Überstände werden dekantiert und die Niederschläge mit dem in den Zentrifugenbechern zurücklaufendem Isolationsmedium (ca. 4,5 ml) vorsichtig resuspendiert. Die vereinigten Suspensionen (20 ml) werden über eine Lage Nylongaze filtriert.

Vier Percoll-Stufengradienten werden in 30 ml Corex[®] Zentrifugenröhrchen durch Unterschichten von je 12 ml 40 % Percoll-Lösung mit je 10 ml 85 % Percoll-Lösung gegossen.

Percoll-Lösungen:

	<u>85 %</u>	<u>40 %</u>
Hepes/KOH, pH 8,0	50 mM	50 mM
D-Sorbit	333 mM	333 mM
Na ₂ -EDTA	1 mM	1 mM
Percoll [®]	85 % (v/v)	40 % (v/v)

Die Gradienten werden mit je 4,8 ml der Etioplastensuspension überschichtet und in 50 ml Polyethylen-Zentrifugenröhrchen (Nalgene) für 7,5 min bei 4100 g zentrifugiert (HB-4 Rotor, 4 °C). Je 5 ml der oben liegenden 40 % Stufen werden abgehoben und verworfen. An der Grenzschicht zwischen den 40 % und den 85 % Stufen werden jeweils 10 ml abgehoben und mit je 30 ml Waschmedium verdünnt.

Waschmedium:

Hepes/KOH, pH 8,0	50 mM
D-Sorbit	333 mM

Diese Verdünnungen werden abschließend für 3 min bei 2600 g zentrifugiert (HB-4 Rotor, 4 °C), die Überstände verworfen, die resultierenden Niederschläge in jeweils 450 µl Waschmedium oder alternativ, je nach Versuchszielsetzung, in jeweils 450 µl Lysis-Puffer resuspendiert und abschließend die Suspensionen zu einem Volumen von 2,3 ml vereinigt.

Lysis-Puffer:

Tricine/KOH, pH 7,2	50 mM
Glycerin	20 % (v/v)

2.2.3 Bestimmung der Etioplastenkonzentration

Die Bestimmung der Zahl der Etioplasten pro μl Suspensionsvolumen erfolgt mit Hilfe eines Hämatozytometers ($0,0025 \text{ mm}^2$, $0,1 \text{ mm}$ Höhe) unter einem 10-fach Phasenkontrast-Objektiv eines Photomikroskops (Leitz).

Die isolierten Etioplasten werden in Waschmedium in einer Verdünnung von 1/500 (v/v) eingesetzt. Die Auszählung wird an 5 von insgesamt 25 Feldern des Hämatozytometers vorgenommen. Die Zahl der Etioplasten/ μl Waschmedium berechnet sich nach folgender Formel.

$$\text{Plastiden}/\mu\text{l} = \text{Anzahl der Plastiden in 5 Feldern} \times 5 \text{ (Anzahl in 25 Feldern)} \\ \times 10 \text{ (Anzahl in einem } \mu\text{l)} \times 500 \text{ (Verdünnungsfaktor)}$$

2.2.4 Elektronenmikroskopische Analyse von Etioplasten (durchgeführt von Prof. Dr. G. Wanner)

Die Etioplasten werden über Nacht in einer isoosmotischen Glutaraldehyd-Lösung fixiert. Nach einer Zentrifugation werden die Plastiden im Niederschlag zunächst dreimal mit Waschmedium (15, 25 und 15 min) und nachfolgend dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen (15, 15 und 60 min). Nach einer Lagerung in Wasser (über Nacht) erfolgt eine Fixierung in einer 1 % Osmiumtetroxid-Lösung und daran anschließend eine Dehydrierung mit steigenden Aceton-Konzentrationen (10, 20, 40, 60, 80 und 100 %). Bei 20 % Aceton wird gleichzeitig mit einer 1 % Uranylacetat-Lösung gefärbt. Es folgt die Einbettung der Etioplasten in Harz und eine Polymerisierung (über Nacht) bei $65 \text{ }^\circ\text{C}$. Ultradünnschnitte werden mit Bleicitrat für 1 min nachgefärbt. Die Untersuchung erfolgt unter einem Elektronenmikroskop der Fa. Zeiss (EM 912).

2.3 Aufreinigung pigmentfreier POR aus Etioplasten

2.3.1 Differentielle Solubilisierung - Ultrazentrifugationsschritte

Allgemeine Arbeitsbedingungen

Alle Arbeitsschritte werden in Dunkelheit oder unter grünem Sicherheitslicht ($<10 \text{ nmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 515-560 nm) durchgeführt. Sämtliche zu verwendende Materialien und Lösungen werden auf Eis gehalten.

Erster Reinigungsschritt

Je 2 ml Sucrose-Puffer in vier Zentrifugenröhrchen (13 x 51 mm, Beckmann) werden mit gleichen Aliquoten aus 2,3 ml der Etioplastensuspension (ET) in Lysis-Puffer (siehe 2.2.2) überschichtet.

Sucrose-Puffer:

Hepes/KOH, pH 7,2	10 mM
Sucrose	500 mM
Tricine	10 mM
Na ₂ -EDTA	1 mM
Magnesiumchlorid-hexahydrat	1 mM

Die erste Vorreinigung erfolgt durch Ultrazentrifugation für 20 min bei 80.000 g (Rotor RPS-55T, 4 °C).

Zweiter Reinigungsschritt

Die Überstände werden dekantiert, die Niederschläge in je 2 ml Detergenspuffer 1 resuspendiert und die Suspensionen vereinigt (N1).

Detergenspuffer 1:

Hepes/KOH, pH 7,2	10 mM
OG	2,5 mM
Glycerin	5 % (v/v)
Tricine	10 mM
Na ₂ -EDTA	1 mM
Magnesiumchlorid-hexahydrat	1 mM

Die Probe wird auf vier 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und für 30 min im Dunkeln, unter langsamer Rotation an einem LKB-Rührer, inkubiert.

Nach der Überführung in vier Zentrifugenröhrchen (siehe oben), folgt eine zweite Reinigung durch Ultrazentrifugation für 20 min bei 80.000 g (Rotor RPS-55T, 4 °C).

Dritter Reinigungsschritt

Die Überstände werden dekantiert, die Niederschläge in je 2 ml Detergenspuffer 2 resuspendiert und die Suspensionen vereinigt (N2).

Detergenspuffer 2:

Hepes/KOH, pH 7,2	10 mM
OG	15 mM
Glycerin	30 % (v/v)
Tricine	10 mM
Na ₂ -EDTA	1 mM
Magnesiumchlorid-hexahydrat	1 mM

Die Probe wird erneut auf vier 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße verteilt und nochmals für 30 min im Dunkeln unter langsamer Rotation inkubiert. Nach der Verteilung auf vier Zentrifugenröhrchen (siehe oben), folgt der letzte Reinigungsschritt durch Ultrazentrifugation für 20 min bei 200.000 g (Rotor RPS-55T, 4 °C).

Die Überstände (Ü3) werden vereinigt und mit NADPH (Endkonzentration 0,3 mM) versetzt.

2.3.2 Chromatographische Reinigung

Allgemeine Arbeitsbedingungen

Die Vorbereitung des Anionenaustauschers (DEAE Cellulose, Sigma) und die Äquilibration werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Der Probenauftrag und die Elution erfolgen unter grünem Sicherheitslicht auf einer bei 0 °C vorgekühlten Säule.

Vorbereitung des Säulenmaterials

Die DEAE Cellulose wird einen Tag vor der Chromatographie in bidestilliertem Wasser zum Quellen gebracht.

Eine Glassäule (9 x 32 mm) wird mit dem gequollenen Material luftblasenfrei gepackt und mit 9 ml Äquilibrationsspuffer bei einer Flußrate von 0,5 ml/min gespült.

Äquilibrationsspuffer:

Hepes/KOH, pH 7,2	10 mM
OG	5 mM
Glycerin	10 % (v/v)
Tricine	10 mM
Na ₂ -EDTA	0,3 mM
Magnesiumchlorid-hexahydrat	0,3 mM

Chromatographie

Aus dem nach der letzten Ultrazentrifugation gewonnenen Überstand (Ü3) werden 6 ml entnommen und diese mit 12 ml Verdünnungsspuffer versetzt.

Verdünnungsspuffer:

Hepes/KOH, pH 7,2	10 mM
Tricine	10 mM

Die Probe mit einem Volumen von 18 ml wird mit einer Flußrate von 0,5 ml/min aufgetragen. Der erhaltene Durchlauf wird verworfen. Die pigmentfreie und reine POR wird nachfolgend mit 12 ml Elutionspuffer von der Säule gewaschen.

Elutionspuffer:

Hepes/KOH, pH 7,2	10 mM
OG	18,3 mM
Glycerin	10 % (v/v)
Tricine	10 mM
Na ₂ -EDTA	0,3 mM
Magnesiumchlorid-hexahydrat	0,3 mM

Das Eluat (EL) wird in Fraktionen von je 2 ml aufgefangen. Die ersten vier Fraktionen werden vereinigt und mit Glycerin und NADPH versetzt. Daraus resultiert eine Erhöhung der Glycerinkonzentration auf 30 % (v/v), eine Absenkung der OG-Konzentration auf 14,25 mM und eine NADPH-Konzentration von 1 mM. Diese Mischung wird mit Reaktionspuffer so verdünnt, daß die Proteinkonzentration bei 30 - 36 µg ml⁻¹ liegt.

Reaktionspuffer:

Hepes/KOH, pH 7,2	10 mM
OG	14,25 mM
Glycerin	30 % (v/v)
NADPH	1 mM
Tricine	10 mM
Na ₂ -EDTA	0,3 mM
Magnesiumchlorid-hexahydrat	0,3 mM

2.3.3 Pigment-Konzentrationsbestimmung

Zur Ermittlung des Gehaltes an Pchlid *a* in den unterschiedlichen Fraktionen der Aufreinigung werden 50 µl bis 200 µl in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Pigmente mit eiskaltem 80 % Aceton extrahiert. Durch eine Zentrifugation bei 14.000 g für 10 min wird der Extrakt von Trübungen befreit, der Überstand abgenommen und zwischen 550 und 750 nm im Spektrophotometer gemessen. Als Referenz dient eine Küvette mit dem gleichen Volumen (50 µl bis 200 µl) des entsprechenden Puffers in 80 % Aceton. Die Konzentration errechnet sich aus dem Wert für das Absorptionsmaximum bei 627 nm unter Berücksichtigung eines millimolaren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{mM} = 30,4 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den Fraktionen erfolgt wie unter 2.5.1 beschrieben.

2.4 Überexpression der POR in *E.coli* und Proteinaufreinigung

2.4.1 Überexpressionsbedingungen

Anzucht

Aus einer Glycerinkultur (50% Glycerin (v/v)) des transformierten *E. coli* Stamms ER 2508 (Genotyp: Ion:Tn10D16D17D(malB)zkb:Tn5D(argFlac)U169D(merCmrr)20ara14gaK2rpsL0xyl-5 mt(1supE44leuB6fhuA2) - zur Verfügung gestellt von Dr. M. Timko - werden 50 µl entnommen und eine Vorkultur in 50 ml LB-Medium (mit Ampicillin/Tetracyclin) angesetzt. Die Anzucht erfolgt aerob, unter starkem Schütteln, bei 37 °C für ca. 14 Stunden.

LB-Medium:

Pepton	10	g/l
Hefe-Extrakt	5	g/l
NaCl	10	g/l
NaOH	20	mg/l

Ampicillin-Stammlösung:

Ampicillin	1,25	g / 50 ml H ₂ O
0,1 N NaOH	250	µl
<i>Arbeitskonzentration:</i>	200	µl / 50 ml LB-Medium

Tetracyclin-Stammlösung

Tetracyclin	125	mg / 10 ml 50 % (v/v) EtOH
<i>Arbeitskonzentration:</i>	50	µl / 50 ml LB-Medium

Je 600 ml LB-Medium (mit Ampicillin/Tetracyclin) werden mit jeweils 25 ml dieser Vorkultur versetzt. Die Anzucht erfolgt unter eben genannten Bedingungen bis eine optische Trübung von 0,6 (gemessen bei 600 nm) erreicht ist. Zu diesem Zeitpunkt wird durch Zugabe von je 0,3 mM Isopropyl-β-D-thiogalactosid die Überexpression induziert und 140 min später werden die Zellen durch Zentrifugation konzentriert. Alle Arbeitsschritte werden von nun an auf Eis oder bei 0 °C bis 4 °C durchgeführt. Nach einer ersten Zentrifugation in Portionen à 200 ml bei 6.000 g für 10 min (Rotor A 6.9, Kontron-Kühlzentrifuge, 4 °C) werden die Überstände dekantiert und die Niederschläge in 12 ml Waschpuffer resuspendiert.

Waschpuffer:

Tris/HCl, pH = 7,5	50	mM
NaCl	500	mM
DTT	1	mM
Na ₂ -EDTA	1	mM

Es folgt eine zweite Zentrifugation bei 6.000 g für 10 min (Rotor A 6.14, Kontron-Kühlzentrifuge, 4 °C) und nach dem Dekantieren der Überstände werden die Niederschläge in je 1 ml Aufschlußpuffer Nr. 1 resuspendiert. Jeweils 400 µl hieraus werden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei - 20 °C gelagert.

<u>Aufschlußpuffer:</u>	<u>Nr. 1:</u>	<u>Nr. 2:</u>
Tris/HCl, pH = 7,5	50 mM	50 mM
NaCl	500 mM	
DTT	1 mM	1 mM
Na ₂ -EDTA	1 mM	1 mM
OG	15 mM	15 mM

2.4.2 Proteinaufreinigung

Allgemeines

Mit Ausnahme des letzten Schrittes werden alle Arbeiten auf Eis bzw. bei 0 °C bis 4 °C durchgeführt.

Zellaufschluß und Solubilisierung

Die gefrorenen Portionen à 400 µl werden in Eiswasser langsam aufgetaut und nachfolgend mit 600 µl Aufschlußpuffer Nr. 2 versetzt. Jede Probe wird sodann für 2 mal 20 s mit Ultraschall (Sonifier GM 70 HD, 40 % Intensität) behandelt und nachfolgend für 30 min bei 11.000 g (4 °C) zentrifugiert. Die Niederschläge werden verworfen, die Überstände vereingt und für die folgende Chromatographie mit Äquilibrationpuffer so stark verdünnt (in der Regel im Verhältniss von ca. 1:4), daß die Proteinkonzentration bei ca. 3 mg/ml liegt.

Affinitätschromatographie

Eine Glassäule (1,5 cm o.d. x 9,5 cm) wird mit 17 ml Amylose (800-21S, New England BioLabs) gepackt und mit dem 5-fachem Säulenvolumen äquilibriert.

Äquilibrationpuffer:

Tris/HCl, pH = 7,5	50 mM
NaCl	200 mM
DTT	1 mM
Na ₂ -EDTA	1 mM

Mit einer Flußrate von 0,5 ml/min wird die Probe, die ca. 150 mg bis 200 mg Protein enthält, aufgetragen. Es folgt zunächst ein Waschschrift mit dem 3-fachen Säulenvolumen an Äquilibrationpuffer und daran anschließend ein weiterer Waschschrift mit einem Säulenvolumen Reaktionspuffer (siehe 2.3.2., jedoch ohne die NADPH Komponente). Die Elution des MBP-POR-Fusionsproteins erfolgt mit 20 ml Elutionspuffer 2.

Elutionspuffer 2:

Hepes/KOH, pH 7,2	10 mM
OG	14,25 mM
Glycerin	30 % (v/v)
Maltose	50 mM
Tricine	10 mM
Na ₂ -EDTA	0,3 mM
Magnesiumchlorid-hexahydrat	0,3 mM

Die vereinigten Fraktionen mit der MBP-POR werden für enzymatische Tests in der Regel auf eine Proteinkonzentration von ca. 90 µg ml⁻¹ verdünnt, wobei 1 mM NADPH zugesetzt wird.

Schneiden des Fusionsproteins

Dem Eluat wird TEV-Protease, Recombinant* (GibcoBRL®) in einer Konzentration von 0,5 U / 3 µg Protein zugesetzt und nachfolgend wird 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wird bei 8 °C für maximal 4 Tage gelagert.

2.5 Proteinanalytik

2.5.1 Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Allgemeines

Grundlegend für diese Bestimmung ist die Eigenschaft des Farbstoffes Coomassie-Brilliantblue G-250 in saurer Lösung sein Absorptionsmaximum von 465 nm im Falle einer Proteinbindung auf 595 nm zu verschieben [Bradford 1976]. Die Methode wird mit einem Protein-Assay der Fa. Biorad durchgeführt.

Testansatz:

Die Bestimmung wird in Halbmicro-Plastikküvetten durchgeführt. 750 bis 790 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ werden mit 50 μl bis 10 μl der zu bestimmenden Proteinlösung (in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ verdünnt) versetzt. Als Nullkontrolle dient eine Referenzlösung gleicher Zusammensetzung ohne Protein. Der resultierende Ansatz mit einem Volumen von 800 μl wird mit 200 μl Dye-Reagenz (Bio-Rad) versetzt und leicht gemischt. Nach 7 min wird die Absorption bei 596 nm gegen die Nullprobe photometrisch gemessen. Die Bestimmung erfolgt immer als Doppelbestimmung von mindestens drei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen im Bereich von ca. 3 - 8 $\mu\text{g/ml}$. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt anhand einer Standard-Eichkurve (Abb. 07), deren Werte eine Bestimmung von BSA Lösungen in linear unterschiedlichen Konzentrationen zugrunde liegt. Absorptionsdaten mit einer Absorption $< 0,1$ bzw. $> 0,45$ werden zur Auswertung nicht herangezogen.

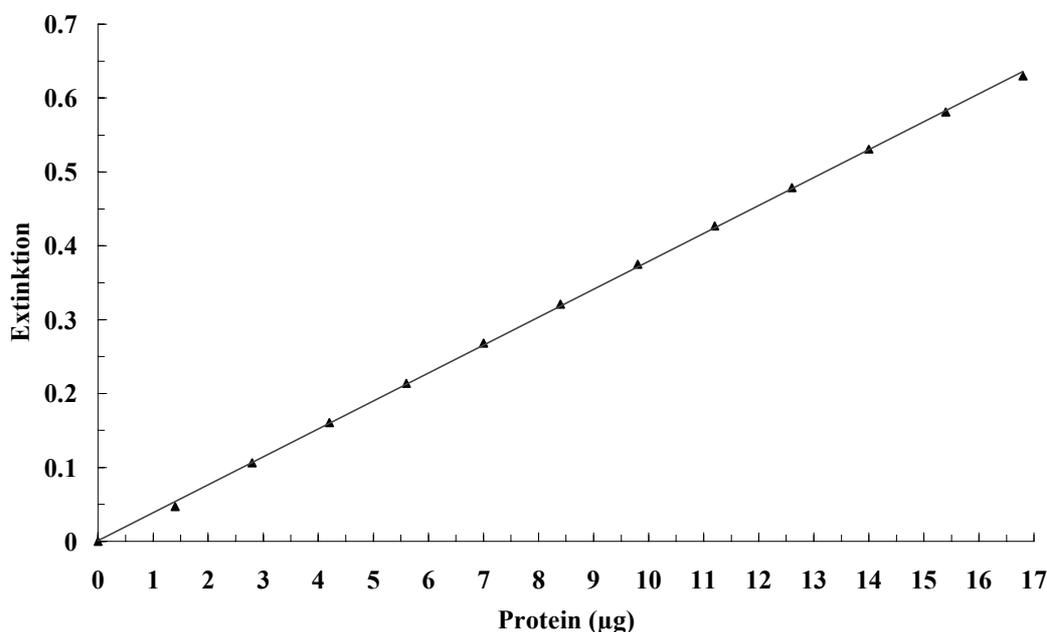


Abb. 07: Protein-Konzentrationsbestimmung - Standard-Eichkurve

Aus einer Stammlösung mit 28 mg Rinderserumalbumin in 10 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ wird 1 ml entnommen und mit 9 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ verdünnt. Hiervon werden 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 und 60 μl in eine Vorlage mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ pipettiert. Zu dem daraus resultierenden Gesamtvolumen von 800 μl werden 200 μl Dye-Reagenz (Biorad) zugefügt, leicht geschüttelt und die Probe für 7 min im Dunkeln ruhen gelassen. Anschließend erfolgt die Extinktionsbestimmung bei einer Wellenlänge von 596 nm gegen eine Referenzlösung aus 800 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ und 200 μl Dye Reagenz.

Die Regressionsanalyse der Eichgerade ergibt einen Steigungswert von $3,78 \cdot 10^{-3}$ mit einem Standardfehler von $0,08 \cdot 10^{-3}$. Der Korrelationskoeffizient liegt mit 0,9997 nahe 1.

2.5.2 Elektrophorese und qualitativer Nachweis der POR

2.5.2.1 SDS-Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese

Konzentrierung und Denaturierung der Proteine

Die Proteine werden durch Fällung mit TCA oder alternativ durch Fällung mit Aceton konzentriert. Eine Probe mit 80 µg Protein in 500 µl wird mit dem gleichen Volumen 20 % (v/v) TCA versetzt und nachfolgend für 30 min auf Eis gestellt. Proteinproben, die mit Aceton behandelt werden, weisen eine Konzentration von 80 µg in 800 µl auf. Die Fällung erfolgt durch Zugabe von 200 µl eiskaltem Aceton und anschließender Lagerung der Probe für mindestens 12 Stunden bei - 20 °C.

Beiden Methoden folgt eine Zentrifugation für 30 min bei 14.000 g (0 °C). Der Überstand wird dekantiert, der Niederschlag mit 1 ml eiskaltem Ethanol gewaschen und nochmals unter den genannten Bedingungen zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird bei der TCA-Fällung einmal wiederholt. Der Niederschlag wird in der Regel mit 42 µl H₂O_{bidest.} und nachfolgend mit 14 µl Proteinauftragspuffer (Roti[®]-Load, Roth) versetzt und die Proteine abschließend für 3 min im Wasserbad bei 100 °C denaturiert.

Trennung der Proteine

Für eine annähernde Bestimmung der Molekulargewichte wird ein SDS-7 Standard (Sigma) oder alternativ ein Prestained-Low-Range-Standard (Bio-Rad) verwendet. Bei letzterem ändert der kovalent gebundene Farbstoff die Molekulargewichte (MW) der Proteine dermaßen, daß vom Hersteller nur empirisch bestimmte Durchschnittswerte angegeben werden

<u>SDS-7:</u>	<u>MW (kDa):</u>	<u>Prestained:</u>	<u>MW (kDa):</u>
Rinderserumalbumin	66	Phosphorylase B	106
Ovalbumin	45	Rinderserumalbumin	80
GAPDH	36	Ovalbumin	49,5
Carboanhydrase (Rind)	29	Carboanhydrase (Rind)	32,5
Trypsin-Inhibitor (Rind)	24	Trypsin-Inhibitor (Rind)	27,5
α-Lactalbumin (Rind)	14,2	Lysozym	18,5

Die Auftrennung der Proteine erfolgt durch Elektrophorese in Polyacrylamidgelen (PAA) in einem diskontinuierlichen Puffersystem zwischen Sammel- und Trenngel.

<u>Komponenten:</u>	<u>Sammelgel:</u>	<u>Trenngel:</u>
Polyacrylamid	5 %	12,5 %
N,N-Methylen-bis-acrylamid	0,1 %	0,3 %
Tris/HCl, pH 6,8	0,125 M	0,375 M
Harnstoff		4 M

Eingesetzt wird eine Elektrophorese-Apparatur der Firma Renner für Gele mit den Ausmaßen 140 x 152 x 1 mm. Der Laufpuffer für die obere und die untere Kammer unterscheidet sich in seiner Konzentration.

<u>Laufpuffer:</u>	<u>oben:</u>	<u>unten:</u>
Glycine	0,192 M	0,096 M
Tris	0,025 M	0,0125 M
SDS	0,1 %	0,05 %

Bis die Proteine an der Grenzschicht zwischen Sammel- und Trenngel konzentriert werden erfolgt die Elektrophorese bei 80 V. Danach werden sie bei 200 V aufgetrennt.

2.5.2.2 Qualitativer Nachweis der POR

„Western-Blotting“

Der Transfer der Proteine von dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell) erfolgt im semi-dry-Verfahren mit einer Semiphor-TE 70-Apparatur der Firma Hoefer Scientific Instruments. Angewendet wird dabei die Methode nach Kyhse-Andersen [1984] in leicht modifizierten Form.

Je zwei Whatman-3MM-Filterpapiere werden 10 min in den folgenden Pufferlösungen eingeweicht.

<u>Komponenten:</u>	<u>Anodenpuffer 1:</u>	<u>Anodenpuffer 2:</u>	<u>Kathodenpuffer:</u>
Methanol	20 % (v/v)	20 % (v/v)	20 % (v/v)
Tris	0,3 M	0,025 M	0,025 M, pH = 9,4
6-Aminohexansäure			0,04 M

Die Nitrocellulosemembran wird für den gleichen Zeitraum in den Anodenpuffer 2 gelegt. Aus den genannten Komponenten wird zusammen mit dem Polyacrylamidgel ein Sandwich gebildet, das mit folgender Orientierung und Reihenfolge in die Apparatur eingebaut wird:

Graphit-Anode mit Plastikrahmen: → zwei Filterpapiere aus Anodenpuffer 1 → ein Filterpapier aus Anodenpuffer 2 → Nitrocellulosemembran aus Anodenpuffer 2 → Gel → ein Filterpapier aus Anodenpuffer 2 → zwei Filterpapiere aus Kathodenpuffer → Kathode.

Der Deckel der Apparatur wird etwas beschwert und die Stromstärke auf 1 mA/cm² Gelfläche festgelegt. Die Zeit für den Transfer beträgt ca. 30 min. Die Membran wird nachfolgend zwischen zwei Filterpapieren getrocknet und entweder in Folie verschweißt und bei - 20 °C gelagert oder sofort für die Antikörperfärbung eingesetzt.

Antikörperfärbung

Im ersten Schritt wird die Membran dreimal für je 10 min in jeweils unverbrauchtem TTBS-Puffer geschwenkt.

TTBS-Puffer:

Tris/HCl, pH 7,5	0,1 M
NaCl	0,9 % (w/v)
Tween 20	0,1 % (v/v)

Für eine Stunde wird die Membran daraufhin mit einem polyklonalen Antikörper in TTBS-Puffer unter leichtem Schwenken inkubiert. Es folgt eine Wiederholung des ersten Schrittes. Im Anschluß daran wird die Membran, wiederum für eine Stunde, mit 30 µl des sekundären Antikörpers anti-rabbit IgG-alkaline-Phosphatase in 40 ml TTBS-Puffer inkubiert. Danach wird letztmalig wie im ersten Schritt beschrieben gewaschen.

Die farbbildende Reaktion erfordert ein Gemisch aus drei Lösungen, das erst unmittelbar vor der Färbung hergestellt wird. Zu 30 ml Alkaline-Phosphatase-Puffer werden 198 µl NBT-Lösung (50 mg p-Nitroblau-tetrazoliumchlorid gelöst in 1 ml 70 % (v/v) DMF) und 99 µl BCIP-Lösung (50 mg 5-brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-toluidin-Salz gelöst in 1 ml 100 % DMF) gegeben. Die Membran wird solange in dieser Mischung geschwenkt, in der Regel zwei bis drei min, bis eine deutliche violette Bandenfärbung sichtbar ist. Die

Farbreaktion wird durch Überführung der Membran in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gestoppt und diese nach dem Trocknen zwischen zwei Filterpapieren im Dunkeln aufbewahrt.

2.5.2.3 Färbung der Polyacrylamidgele

Die Detektion aller Proteine wird durch eine Silberfärbung oder eine Anfärbung mit Coomassie-Lösung erreicht.

Silberfärbung

Die Färbung erfolgt nach der Methode von Heukeshoven *et al.* [1985]. Zunächst wird das Polyacrylamidgel 30 min fixiert. Es folgt eine Inkubation über 120 min mit Lösung Nr. 1 und nach 6-maligem Waschen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ für jeweils 5 min, wird das Gel 45 min in Lösung Nr. 2 getränkt. Alle genannten Schritte erfolgen unter leichtem Schütteln. Abschließend wird das Gel für 60 s mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gewaschen und die Proteinbanden in einer Entwickler-Lösung sichtbar gemacht. Ist dies erfolgt wird die Farbreaktion in einer Stopp-Lösung beendet. Vor dem Trocknen des Gels (siehe Coomassie-Färbung) wird mehrfach mit Leitungswasser gewaschen.

<u>Fixierer</u>		<u>Lösung Nr. 2</u>	
Ethanol	40 % (v/v)	Silbernitrat	0,1 % (w/v)
Eisessig	10 % (v/v)	Formaldehyd	0,02 % (v/v)
		<u>Entwickler</u>	
<u>Lösung Nr. 1</u>		Natriumcarbonat	2,5 % (w/v)
Ethanol	30 % (v/v)	Formaldehyd	0,01 % (v/v)
Glutaraldehyd	0,5 % (v/v)		
Natriumacetat	0,5 M	<u>Stopp-Lösung</u>	
Natriumthiosulfat	0,2 % (w/v)	$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	0,05 M

Coomassie-Färbung

Das Gel wird 15 min in einer Coomassie-Lösung und nachfolgend, bis zur Entfärbung des Hintergrundes, in einer Entfärber-Lösung geschwenkt.

<u>Komponenten:</u>	<u>Farbstofflösung:</u>	<u>Entfärber:</u>
Methanol	40 % (v/v)	40 % (v/v)
Eisessig	10 % (v/v)	10 % (v/v)
Coomassie-Blue R 250 (Serva)	0,1 % (w/v)	

Zwischen zwei Einmachfolien fixiert, folgt die Trocknung der Gele auf einem Geltrockner bei 80 °C im Vakuum für ca. 40 min.

2.5.2.4. Densitometrische Auswertung

Die gefärbten und getrockneten Gele werden auf einem Scanner (Paragon 1200-SP, Mustek) im Graustufen-Modus mit einer Auflösung von 1050 dpi gescannt. Die Software (Raytest-Instruments) gestützte Bestimmung der relativen Graustufenintensität einer einzelnen Proteinbande, im Verhältnis zu den anderen Banden einer Spur im Gel, erfolgt nach Abzug des Hintergrundes dieser Spur.

2.6 Herstellung und Charakterisierung exogener Pigmente

Dieses Kapitel gibt eine Übersicht über die Herstellung und Methoden zur Charakterisierung von Substratanalogen von Pchlide *a*.

2.6.1 Herstellung

Die Pigmente (**2**) - (**11**) werden von Dr. M. Helfrich, das Pigment (**12**) von Dr. S. Schoch zur Verfügung gestellt. Die Präparationen erfolgen unter grünem Sicherheitslicht oder schwachem Weißlicht.

Alle nicht natürlich vorkommenden Porphyrin-artigen Pigmente werden nach Helfrich *et al.* [1996] durch Oxidation der entsprechenden Chlorinderivate mit 2,3-dichlor-5,6-dicyan-p-benzochinon (DDQ, Merck) hergestellt und durch HPLC an einer Polyethylen-Säule (300 x 19 mm) gereinigt Helfrich *et al.* [1999]. Stehen nur Chlorophyllderivate als Ausgangsmaterial zur Verfügung, wird zuvor der Phytylester mit Trifluoressigsäure (TFA) verseift (Schoch *et al.*, 1995). Das bei dieser Methode herausgelöste zentrale Magnesium-Ion wird durch Insertion von Zn ersetzt [Helfrich *et al.* 1994]. Die Chlorinderivate werden mit präparativer HPLC auf einer ODS-Säule (300 x 19 mm; Bondapack C18, 125 Å, 10 µm, Waters) getrennt. Als Lösungsmittel A wird 50 % Aceton mit 25 mM Ammoniumacetat, als Lösungsmittel B 100 % Aceton eingesetzt. Die Trennung erfolgt unter isokratischer Elution bei 50 - 60 % Aceton, je nach Polarität des jeweiligen Pigments.

(1) Pchlide *a*

Pchlide *a* wird aus etiolierten, mit ALA inkubierten Primärblättern des Hafers gewonnen. Die Anzucht erfolgt wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben. Nach 7 Tagen werden die Primärblätter (200 g Frischgewicht) knapp oberhalb der Karyopsen abgeschnitten und in 2 Bechergläsern mit je 50 ml ALA-Lösung 14 Stunden in einem gut durchlüfteten, dunklen Schrank bei Raumtemperatur infiltriert.

ALA-Lösung:

K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ Puffer, pH=6.5	35 mM
ALA	5 mM

Die Keimlinge werden nachfolgend gewaschen und gut getrocknet, sodann in 0,5 cm Stücke geschnitten, portionsweise mit flüssigem Stickstoff gefroren und in einem Warring-Blender pulverisiert. Das Pulver wird zunächst in 800 ml 75 % (v/v) abgepuffertem Aceton und im Anschluß über eine Baumwollgaze in einen 2 l Scheidetrichter überführt.

Aceton gepuffert:

Tricine/KOH, pH 7,5	10 mM
Aceton (technisch)	75 % (v/v)

Mit 800 ml destilliertem und peroxidfreiem Ether wird einmal ausgeschüttelt, die Acetonphase verworfen, zur Etherphase 800 ml Petrolether (40-60 °, p.A) zugegeben und solange gemischt, bis eine Phase vorliegt. Eine, sich eventuell unten bildende, restliche Acetonphase wird verworfen. Nach Zugabe von 1/10 Volumen methanolischer Ammoniak-Lösung (MeOH:0,01 NH₃ = 4:1) wird einmal ausgeschüttelt und die Etherphase verworfen. Die grünliche methanolische Phase wird fünfmal mit 1/10 Volumen einer Mischung von Ether und Petrolether im Verhältnis 1:1 nachgewaschen. Nachfolgend wird die methanolische Phase vorsichtig in einen Scheidetrichter mit einer Vorlage von 90 ml H₂O / 30 ml Ether überführt.

Durch Ausschütteln wird Pchlide *a* in die Etherphase transferiert. Diese wird zwei mal für 10 min über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und zur Trockne eingengt. Die Ausbeute liegt bei ca. 1,5 μmol Pchlide *a*.

(2) [8-Vinyl]-Pchlide *a*

Die Isolierung erfolgt nach Helfrich *et al.* [1999] aus *Prochloron sp.* (aus *Lissoclinum patella*).

(3) Pchlide *b*

Die Herstellung erfolgt durch DDQ-Oxidation von Chlide *b*, welches aus Blättern von *Ailanthus altissima* nach Helfrich *et al.* [1994] isoliert wird.

(4) Chl *c*₁ / *c*₂ und *c*₃

Die Isolierung von Chl *c*₁ / *c*₂ erfolgt nach Jeffrey [1972] aus gefriergetrockneten Proben der Braunalge *Endarachne bighamiae* (gesammelt in Clovelly Beach, Sidney, Australien). Chl *c*₃ wird nach gleicher Methode aus einer gefrorenen Probe von *Emiliana huxleyi* (zur Verfügung gestellt von dem Alfred Wegener Institut, Bremerhaven) isoliert.

(5) Zn-[3-acetyl]-Protopheide *a* und Zn-[3-acetyl]-Pheide *a*

Bacteriochlorophyll *a* wird nicht vollständig mit DDQ oxidiert. Die entstehenden Produkte [3-Acetyl]-Chl *a* und [3-Acetyl]-PChl *a* werden über HPLC an Polyethylen getrennt und nachfolgend, wie unter 2.6.1 angegeben, weiter verarbeitet.

(6) Zn-[3-formyl]-Protopheide *a* und Zn-[3-formyl]-Pheide *a*

Die Herstellung erfolgt aus [3-Formyl]-Pheide *a*-methylester (zur Verfügung gestellt von H. Snigula, LMU München). Eine konzentrierte Lösung von ca. 12 μmol Methylester in einigen ml Aceton wird in ca. 500 ml 30 % wässriger HCl hydrolysiert. Nach 2 Stunden unter gelegentlichem Schütteln wird das Produkt durch Neutralisation der HCl-Phase mit Natriumhydrogencarbonat in Ether re-extrahiert. Nach Zn-Insertion ergeben sich 8 μmol Zn-[3-formyl]-Pheide *a*. 5 μmol hiervon werden mit DDQ zu Zn-[3-formyl]-Protopheide *a* oxidiert.

(7) Zn-7¹-hydroxy-Protopheide *a*

Die Präparation erfolgt nach Scheumann *et al.* [1996] aus dem entsprechenden Chlorin-Derivat. Da die Oxidation mit DDQ auch zu Nebenprodukten (Zn-Protopheide *b* und Zn-Pheide *b*) führt, wird ein großer Überschuss an DDQ vermieden und die Aufreinigung möglichst schnell durchgeführt.

(8) Zn-Protopheide *a*-methylester

Die Herstellung erfolgt aus Pheide *a*-methylester durch Zn-Insertion und nachfolgende Dehydrogenierung mit DDQ.

(9) Zn-[13¹-hydroxy]-Protopheide *a*

Pheophytin *a* wird nach Wolf & Scheer [1971] mit NaBH₄ reduziert, die Phytol-Seitenkette mit TFA entfernt und Zn inseriert. Abschließend wird mit DDQ dehydrogeniert.

(10) Zn-13¹-desoxo-13¹, 13²-didehydro-Protopheide *a*

Die Präparation erfolgt nach Wasielewski & Thompson [1978] zunächst durch Reduktion von Phe *a* mit NaBH₄, gefolgt von der Eliminierung von Wasser mit Trifluoracetyl-imidazol (Aldrich) und nachfolgender Entfernung von Mg und Phytol mit TFA. Nach Zn-Insertion wird mit DDQ dehydrogeniert.

(11) Zn-[3-vinyl]-rhodoporphyrin-15-[13,15-dimethyl]-essigester

Pheide *a* wird nach Fischer & Stern [1940] methanolysiert und nach Zn-Insertion mit DDQ dehydrogeniert.

(12) Zn-Protopheide *a*

Die Präparation erfolgt nach Schoch *et al.* [1995] durch Oxidation von Zn-Pheide *a* mit DDQ.

2.6.2 UV/Vis- und MS-Daten

UV/Vis-Absorptionsspektren werden bei Raumtemperatur in einem Zweistrahl-Spektrophotometer (UV 2401 PC, Shimadzu) gemessen.

Die Massenspektrometrie (durchgeführt von Dr. J. Winkler und M. Urzinger) erfolgt mit Electrospray-Ionisation. Das System besteht aus einer HPLC-Einheit (HP 1100) und dem Massenspektrometer (Finnigan LCQ). Porphyrinartige Pigmente werden vor dem Einspritzen, aufgrund ihrer schlechteren Löslichkeit in Aceton im Vergleich zu den Chlorinartigen Pigmenten, erst mit einer Spur Pyridin angelöst. Die Elution erfolgt mit einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser im Verhältnis 80:20. Die Detektion am Massenspektrometer wird im positiven Ionen-Modus durchgeführt. Dieser ist im Allgemeinen empfindlicher gegenüber Chlorin-artigen Pigmenten im Vergleich zu Ihren Porphyrinartigen Pendants.

Pchlide *b*

MS:

drei clusters bei m/z:	1253 (2 [M+H] ⁺)	1879 (2 [M+H] ⁺)	627 ([M+H] ⁺)
% gefunden:	100	81	11

Zn-[3-acetyl]-Protopheide *a*

UV/Vis

in Aceton, 0,3% DMSO:

<u>λ_{\max} (relative Absorption, nm)</u>		
435 (1,000)	634 (0,144)	

Zn-[3-acetyl]-pheide *a*

UV/Vis

in Aceton, 0,3% DMSO:

<u>λ_{\max} (relative Absorption, nm)</u>		
386 (0,541)	432 (1,000)	577 (0,076)
622 (0,137)	670 (0,763)	

MS

zwei schwach aufgelöste Peaks bei m/z:
% gefunden:

1339 (2 [M+H] ⁺)	669 ([M+H] ⁺)
100	54

Zn-[3-formyl]-Protopheide *a*

UV/Vis

in Aceton:

in Aceton, 0,3% DMSO:

in 99,5% Aceton, 0,5% Pyridin:

<u>λ_{\max} (relative Absorption, nm)</u>		
445 (1,000)	634 (0,163)	685 (0,984)
438 (1,000)	641 (0,171)	
440 (1,000)	638 (0,147)	

MS

Molekülionencluster bei m/z:

% gefunden:

% berechnet für C₃₅H₃₀N₄O₆Zn + [H]⁺:

Fragmentcluster bei m/z:

% gefunden:

657	658	659	660	661	662	663
100	43	60	33	49	16	5
100	40	66	33	47	17	5
629	597					
13	34					

Zn-[3-formyl]-pheide *a*

<u>UV/Vis</u>	<u>λ_{\max} (relative Absorption, nm)</u>		
in Aceton, 0,3% DMSO:	392 (0,566)	446 (1,000)	590 (0,086)
	634 (0,151)	683 (1,031)	

Zn-7¹-hydroxy-Protopheide *a*

<u>UV/Vis</u>	<u>λ_{\max} (relative Absorption, nm)</u>		
in Aceton, 0,3% DMSO:	433 (1,000)	567 (0,048)	617 (0,119)

Zn-Protopheide *a*-methylester

<u>UV/Vis</u>	<u>λ_{\max} (relative Absorption, nm)</u>		
in Aceton:	436 (1,000)	570 (0,055)	624 (0,161)

<u>MS</u>						
Molekülionencluster bei m/z:	667	668	669	670	671	672
% gefunden:	100	49	77	40	57	18
% berechnet für C ₃₆ H ₃₄ N ₄ O ₅ Zn + [H] ⁺ :	100	42	67	34	50	18
Dimercluster mit höchstem Peak bei m/z:	1338					
% gefunden:	60					

Zn-[13¹- hydroxy]-Protopheide *a*

<u>UV/Vis</u>	<u>λ_{\max} (relative Absorption, nm)</u>		
in Diethylether:	421 (1,000)	553 (0,114)	596 (0,054)

<u>MS</u>						
Molekülionencluster bei m/z:	685	686	687	688	689	690
% gefunden:	100	42	58	36	41	16
% berechnet für C ₃₅ H ₃₄ N ₄ O ₅ Zn + [H] ⁺ :	100	41	67	33	47	17

Zn-13¹- desoxo-13¹, 13²-didehydro-Protopheide *a*

<u>UV/Vis</u>	<u>λ_{\max} (relative Absorption, nm)</u>		
in Aceton:	368 (0,803)	502 (1,000)	682 (0,177)
in Pyridin:	392 (0,756)	508 (1,000)	693 (0,178)

Zn-[3-vinyl]-rhodoporphyrin-15-[13,15-dimethyl]-essigester

<u>UV/Vis</u>	<u>λ_{\max} (relative Absorption, nm)</u>		
in DMF:	422 (1,000)	554 (0,053)	598 (0,053)

<u>MS</u>							
Molekülionencluster bei m/z:	685	686	687	688	689	690	691
% gefunden:	100	44	70	28	49	12	8
% berechnet für C ₃₆ H ₃₆ N ₄ O ₆ Zn + [H] ⁺ :	100	42	67	34	50	18	5
Dimercluster mit höchstem Peak bei m/z:	1373						
% gefunden:	10						

2.6.3 Bestimmung von Extinktionskoeffizienten

Für eine Auswertung kinetischer Daten der Photoreduktion von Substraten der POR (3.2.1.1, Abb. 27) werden die Extinktionskoeffizienten aller Produkte und Edukte in Reaktionspuffer bestimmt. Hierfür werden 10 μl einer $375 \pm 25 \mu\text{M}$ Lösung des Pigments in DMSO in eine verschließbare Küvette mit 2990 μl Aceton bzw. 2990 μl Reaktionspuffer pipettiert. Aus UV/Vis-Spektren von je drei bis vier Parallelproben werden die Absorptionsmaxima im Bereich der Q_y -Bande (zum Teil auch anderer Banden) gemittelt und miteinander verglichen. Aus diesen Vergleichsdaten werden Faktoren ($A_{\text{puffer}} / A_{\text{Lsg.mittel}}$) bestimmt, die durch Multiplikation mit bekannten oder zum Teil abgeschätzten Koeffizienten der Pigmente in Lösungsmitteln die Extinktionskoeffizienten für die Pigmente in Reaktionspuffer ergeben.

2.6.4 Bestimmung der relativen Fluoreszenzquantenausbeute von substratanalogen Pigmenten der POR im Vergleich zu Pchlid *a*

Gleiche Pigmentkonzentrationen (6 mM) werden in je 2 ml 80 % (v/v) Aceton (mit 0,3 % DMSO) gelöst und UV/Vis spektroskopisch in verschließbaren Fluoreszenzküvetten zwischen 350 und 800 nm vermessen. Anschließend wird ein Fluoreszenz-Emissionsspektrum aufgenommen, wobei die Anregung jeweils im vorher bestimmten Soretmaximum liegt. Nachfolgend wird die Probe mit 2 ml 80 % Aceton verdünnt, hieraus 2 ml entnommen und wiederum ein UV/Vis- und Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Dieser Schritt wiederholt sich noch 2 mal. Fluoreszenz-Emissionsspektren (in der Regel aus den Verdünnungen mit 3, 1,5 und 0,75 mM Pigment), die eine der Verdünnung entsprechend lineare Abnahme der Fluoreszenz zeigen, werden über die gesamte Fläche zwischen 580 nm und 750 nm integriert und diese in Relation zu der im Absorptionsmaximum der Q_y Bande bestimmten Pigmentmenge gesetzt. Die so berechneten Flächen pro nmol Pigment für PChlide *a* werden als 100 % gesetzt und die Flächen pro nmol der anderen Pigmente hierzu verglichen.

2.7 Isolierung und Analytik von Lipiden aus Etioplasten

Allgemeines:

Die Isolierung wird in Anlehnung an die Methode von Sprague & Staehelin [1987] durchgeführt. Alle verwendeten organischen Lösungsmittel sind eisgekühlt und mit Stickstoff gesättigt. Die Extraktion und Auftrennung der Lipide erfolgen unter Grünlicht, die Auftrennung zusätzlich bei 4 °C.

2.7.1 Extraktion der Lipide aus Etioplasten

Ausgangsmaterial sind die in Punkt 2.2.2 über eine Percoll-Gradienten von anderen Organellen und Membranbruchstücken gereinigten intakten Etioplasten. Die Plastiden im Niederschlag werden in 30 ml (1 Volumen) eiskaltem Resuspensionspuffer Nr. 2 resuspendiert und 30 min auf Eis belassen.

Resuspensionspuffer Nr. 2, pH = 7,2:

Natriumdihydrogenphosphat	50 mM
Sucrose	300 mM
Kaliumchlorid	100 mM

Die Extraktion der Lipide erfolgt durch Zugabe von 300 ml Dichlormethan/Methanol (1 : 2). Der Extrakt wird über vier Lagen Baumwollgaze filtriert und der Filtrationsrückstand mit 100 ml Dichlormethan nachextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden im Scheidetrichter mit 150 ml einer 0,1 M Kochsalzlösung gewaschen. Die wässrige Phase wird abgetrennt, mit 60 ml Dichlormethan nachgewaschen und die vereinigten organischen Phasen (ca. 240 ml) am Rotationsverdampfer im Dunkeln auf 40 ml eingengt. Der Extrakt wird unter Stickstoff über Nacht bei - 20 °C gelagert.

2.7.2. Chromatographische Reinigung

Die Lipidklassen in dem konzentrierten Extrakt werden durch Säulenchromatographie auf Kieselgel (Kieselgel 60, 0,015-0,040 mm, Merck) aufgetrennt. Verwendet wird eine Glassäule (1,9 cm x 30 cm), die mit 28 g, in Dichlormethan aufgeschlemmten und entgastem Kieselgel gepackt wird. Die Säule wird mit 60 ml Dichlormethan äquilibriert und nachfolgend der Extrakt aufgetragen. Nach dem Durchlauf werden die Pigmente und Lipide stufenweise mit jeweils 40 ml (Dichlormethan/Dichlormethan-Aceton/Aceton), bzw. 24 ml (Aceton-Methanol Gemische) Lösungsmittel und Lösungsmittelgemischen in der angegebenen Reihenfolge eluiert.

Elutionsschritte:

Dichlormethan > Dichlormethan/Aceton (2 : 1) > Dichlormethan/Aceton (1 : 2) > Aceton > Aceton/Methanol (4 : 1) > Aceton/Methanol (3 : 1) > Aceton/Methanol (2 : 1) > Aceton/Methanol (1 :1) > Methanol

Die Eluate aus Aceton/Methanol Gemischen werden in 8 ml Portionen, die übrigen Eluate im Ganzen aufgefangen und am Rotationsverdampfer eingengt. Die Rückstände werden in 2 ml Methanol aufgenommen, hieraus 10 bis 50 µl für die Lipidanalyse entnommen, und der Rest in kleinen, verschließbaren Probengläschen portioniert. Nach dem Abblasen des Methanols über Stickstoff werden die Proben bei - 20 °C gelagert.

2.7.3 Dünnschichtchromatographische qualitative Analyse

Die Lipide der einzelnen Fraktionen werden über Dünnschichtchromatographie an Kieselgel 60-HPTLC-Alufolien (10 cm x 10 cm) mit Fluoreszenzindikator aufgetrennt. Sie werden zunächst einmal in dem Laufmittel (Chloroform/Methanol/Wasser, 65:25:4) entwickelt um gelb gefärbte Verunreinigungen an den oberen Rand der Platte zu bringen. Nach dem Probenauftrag (5 bis 25 µl) erfolgt der etwa fünfzehnminütige Lauf bis etwa 2 cm unter den oberen Rand. Nach der Behandlung mit dem Sprühreagens [De Santis-Maciossek *et al.* 1999] wird bei 100 °C für 20 min entwickelt. Die Detektion von MGDG und DGDG erfolgt anhand der Färbung und der r_f -Werte von Referenzlipiden (zur Verfügung gestellt von G. Henkelmann).

Detektion:

Das Sprühreagens wird durch Mischung zweier Lösungen hergestellt. Für die erste Lösung werden 2 g Eisen(II)-Sulfat in 120 ml Wasser, für die zweite 180 mg Kaliumpermanganat in 80 ml Wasser gelöst. Letztere wird vor der Vereinigung beider Lösungen noch mit 6 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt.

2.7.4. Herstellung von Lipid-Pigment-Gemischen für enzymatische Tests

Lipid-Pigment-Mischungen für die Verwendung in enzymatischen Tests mit der POR:
Die Fraktion mit MGDG wird mit der Fraktion, die im wesentlichen aus DGDG besteht derart gemischt, daß beide Lipidkomponenten annähernd im Verhältnis 1:1 vorliegen (Überprüfung durch DC-Kontrolle). Nach der Entfernung des Lösungsmittels durch Abblasen wird das Gewicht ermittelt. Je 8 mg werden in 6 µl DMSO aufgenommen und mit 3 µl einer Zn-Protopheide α -Lösung (2 nmol/µl) in DMSO gemischt. Die Mischung wird nicht gelagert, sondern unverzüglich für die Enzymtests herangezogen, wobei 3 µl dieser Lösung pro nmol POR in 1 ml Reaktionspuffer eingesetzt werden.

2.8 Enzymatische Tests

Spektroskopisch untersucht wird zum einen die Substratspezifität der POR sowie der kinetische Verlauf der Photoreduktion, zum anderen die Verschiebungen der Absorptionsmaxima vor und nach der Reaktion. Soweit nicht anderweitig beschrieben werden diese Tests unter den folgenden gleichbleibenden Bedingungen und Voraussetzungen durchgeführt.

Cofaktor und Substrate der POR

Die Testansätze enthalten 1 mM NADPH. Sofern die Reaktion mit exogenen, in DMSO gelösten Pigmenten untersucht wird, übersteigt die DMSO Konzentration im Testansatz 5 µl/ml nicht.

Temperatur- und Lichtbedingungen

UV/Vis-spektroskopische Analysen werden bei Raumtemperatur, Fluoreszenzmessungen bei -196 °C durchgeführt. Reaktionen vor Belichtung werden unter grünem Sicherheitslicht (siehe 2.2.2) oder in Dunkelheit verfolgt. Wird eine Probe belichtet, erfolgt dies unter genau definierten Lichtverhältnissen. Als Lichtquelle dient, sofern nicht anders beschrieben, eine Kaltlichtlampe mit Lichtleiter (KL 2500, Schott), die weißes Licht liefert. Ein Lichtmeßgerät (LI-COR -189, Bachofer) erfasst die eingesetzten Lichtintensitäten in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sofern nicht anders erwähnt, werden $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ verwendet.

Einstellungen der Meßbedingungen am Spektrophotometer

Die Messungen erfolgen, soweit nicht ausdrücklich anders beschrieben, bei einer Spaltbreite von 5 nm mit einer Geschwindigkeit von ca. $1.500 \text{ nm min}^{-1}$ in 1 nm Schritten.

2.8.1 Bestimmung der spezifischen Aktivität in der Aufreinigung der POR aus Hafer

Probenvorbereitung

Die bei der Isolierung von Etioplasten resultierenden Niederschläge (2.2.2) sowie die Niederschläge (N1 und N2) der weiteren Aufreinigungsfraktionen (2.3) werden in Reaktionspuffer resuspendiert. Die Fraktion Ü3 bleibt unverändert, die Fraktion EL (pigmentfreie POR) wird zusätzlich mit 1 µl einer 1 mM Pchlid *a* Lösung versehen. Die Proben werden 30 min auf Eis leicht geschwenkt und in Plastik Halbmicro-Küvetten überführt.

Durchführung

Die Absorptionsspektren der zum Teil leicht trüben Proben werden zwischen 550 nm und 750 nm gegen Reaktionspuffer als Referenz gemessen. Als Lichtquelle für die enzymatische Reaktion dient ein Photoblitzlicht (Metz, 45-CT-1), der 25 cm über dem Küvettenhalter fixiert ist. Nach jedem einzelnen, von insgesamt 20 Blitzen im Abstand von je 45 s, wird ein Spektrum aufgenommen. Mit Ausnahme der Fraktion EL werden die Proben nun mit exogenem Pchlid *a* in derselben Konzentration, in der ursprünglich endogenes Pchlid *a* vor der Belichtung enthalten war, versetzt und in der Folge Belichtungen und Messungen erneut, wie eben beschrieben, durchgeführt.

2.8.2 Untersuchungen zur Substratspezifität der POR und zur Kinetik der Reaktion

Allgemeines

Die unter Punkt 2.6.1 aufgeführten Pigmente werden auf Ihre Eignung als Substrate für die POR spektroskopisch und mittels analytischer HPLC untersucht. Der kinetische Verlauf der Photoreduktion der Substrate wird analysiert und nicht akzeptierte Substrate auf eine mögliche Hemmwirkung für die Reaktion getestet. Alle Versuche werden mit der pigmentfrei isolierten POR aus Hafer in Reaktionspuffer (2.3.2) durchgeführt.

2.8.2.1 Substratspezifität

2.8.2.1.1 UV/Vis-spektroskopische Analyse

750 µl der Präparation werden entnommen, in eine Halbmicro-Küvette überführt und 1 - 2 µl des jeweils zu untersuchenden Pigmentes aus einer 1 mM Lösung zugesetzt. Für den Nachweis, daß die Lichtquelle des Spektrophotometers unter den gegebenen Bedingungen keine Photoreduktion auslöst, werden zunächst fünf UV/Vis-Spektren zwischen 300 und 800 nm aufgenommen. Die Referenzküvette enthält Reaktionspuffer mit oder ohne dem pigmentfreiem Enzym.

Die Probenküvette wird nachfolgend horizontal in einem Schüttler fixiert und unter leichtem Schwenken mehrfach mit einer Lichtintensität von ca. $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ belichtet. Die Zeiten der einzelnen Belichtungsintervalle variieren zwischen 10 und 140 s. Um sicher zu stellen, daß diese Lichtintensität sättigend für die Reaktion ist, wird in einem gleichartig geführtem Kontrollversuch die Intensität auf $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ erhöht.

Erfolgt nach 3 min Belichtung keine Photoreduktion, wird das entsprechende Pigment auf seine mögliche Eigenschaft als Hemmstoff getestet. Hierzu wird 1 µl einer 1 mM Zn-Protopheide α Lösung zugesetzt und die Belichtung wie beschrieben wiederholt.

Nach Beendigung der Tests werden alle Proben für eine weitergehende Analyse mittels HPLC in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Auswertung des kinetischen Verlaufs der Reaktion erfolgt durch Bildung von Differenzspektren aller belichteten Probenspektren gegen das Spektrum der unbelichteten Probe. Nach kleineren Basislinienkorrekturen erfolgt die Berechnung der Menge des gebildeten Produktes aus den Werten der positiven Extinktionsdifferenzen in der Q_Y -Bande.

2.8.2.1.2 HPLC-Analyse

Die Pigmente der gefrorenen Enzymtestproben werden mit 2,2 ml Aceton extrahiert und nachfolgend in wenig Ethylacetat transferiert. Die Ethylacetatphase wird abgehoben, zur Trockne eingedampft und die Pigmente in 10 µl Aceton gelöst. Die Auftrennung der Edukte und Produkte wird durch die Kombination von zwei verschiedenen stationären Phasen erreicht. Die Trennung der Pigment Gemische erfolgt zunächst auf einer ODS-Säule (250 x 4,6 mm, Rosil C-18, 5 µm, Grom), daran anschließend auf einer nachgeschalteten, selbst gepackten Polyethylen-Säule (250 x 4,6 mm). Die Flußrate beträgt $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, der Gradient besteht aus Aceton und 25 mM Ammoniumacetat.

Gradientenprogramm:

Zeit (min):	0	33	40	50
Kanal A (100% 25 mM NH_4OAc):	50 %	33 %	0 %	0 %
Kanal B (100% Aceton):	50 %	67 %	100 %	100 %

Alle Pigmente aus den Enzymtests werden durch Co-Chromatographie mit den authentischen Pigmenten verglichen. Die Identifikation erfolgt anhand eines Vergleichs der Retentionszeiten bei einer Detektionswellenlänge von 435 nm.

2.8.2.2 Hemmung der Photoreduktion

Untersucht wird der Einfluß eines Substratüberschusses an PChlide *a* und PChlide *b* auf die Geschwindigkeit der Umsetzung. Die K_M -Werte der genannten Pigmente und der Einfluß von Chl *c₁* auf den K_M -Wert von Pchlide *a* werden bestimmt.

2.8.2.2.1 Hemmung durch Substratüberschuß - Bestimmung des Substratoptimums

Die Testbedingungen und die Durchführung erfolgen wie unter 2.8.2.1 beschrieben. Die Konzentration an POR in der Probe wird unter Anwendung der in Punkt 2.5.1 beschriebenen Methode bestimmt und entspricht $0,75 \text{ nmol ml}^{-1}$. Die Reaktion wird bei einer Belichtungsdauer von 60 s mit fünf verschiedenen PChlide *a* ($0,3$ bis $3,5 \text{ nmol ml}^{-1}$) sowie vier verschiedenen Pchlide *b* ($0,3$ bis $2,1 \text{ nmol ml}^{-1}$) Konzentrationen gemessen.

2.8.2.2.2 Bestimmung der K_M - und v_{\max} -Werte für PChlide *a* bzw. PChlide *b*

Sie erfolgt unter den gleichen in 2.8.2.1 beschriebenen äußeren Testbedingungen. Die Enzymtest-Ansätze - mit gleicher Proteinkonzentration - werden mit folgenden Pigmentmengen versetzt und vor der Belichtung für 5 min im Dunkeln inkubiert:

Pchlide *a* [μM]: $0,56 - 0,70 - 0,86 - 1,12$

Pchlide *b* [μM]: $0,62 - 0,93 - 1,03 - 1,29$

Die Belichtungsintervalle werden für die ersten 60 s gesamte Belichtungsdauer auf je 5 s begrenzt. Die Menge des gebildeten Produktes in Abhängigkeit der Zeit, ergibt, in einem Diagramm aufgetragen, den Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit als Kurve. Die annähernd maximale Reaktionsgeschwindigkeit für jeden Test wird graphisch durch Anlegen einer Tangente im steilsten Anfangsbereich der Kurve ermittelt. Die so erhaltenen Werte für die Anfangsgeschwindigkeiten werden doppelt-reziprok gegen die entsprechenden Pigmentkonzentrationen in einem Lineweaver-Burk-Diagramm aufgetragen.

2.8.2.2.3 Bestimmung des K_M - und v_{\max} -Wertes für Pchlide *a* in Anwesenheit von Chl *c₁*

Vor der Bestimmung wird dem Punkt 2.8.2.2.1 folgend zunächst das Substratoptimum für Pchlide *a* bestimmt. Dieser Wert dient dazu die Menge an Chl *c₁* (hier ca. $0,65 \mu\text{M}$) festzulegen, mit denen die Testansätze vor Zugabe des Pchlide *a* ($0,2$ bis $0,55 \mu\text{M}$) für 5 min inkubiert werden. Der weitere Verlauf der Testreihe entspricht dem eben geschilderten Ablauf der K_M -Wert Bestimmung für Pchlide *a*.

2.8.3 Untersuchungen zum spektralen Verlauf der Photoreduktion

Die unterschiedlichen Absorptionsmaxima bei endogenen und exogenen Pigmenten vor und nach einer Belichtung der Etioplastenfraktion (2.2.2) und der Fraktionen Ü3, EL (2.3) sowie der MBP-POR-Fraktion (2.5.1) werden analysiert. Untersucht wird dabei der Einfluß unterschiedlicher Glycerinkonzentrationen und die Gegenwart von Lipiden.

2.8.3.1 Der Verlauf in Abhängigkeit von der Glycerinkonzentration

Der spektrale Verlauf der Photoumwandlung wird vor und nach einer Dialyse der Proben gegen einen 80 % Glycerin-Dialysepuffer untersucht. Für die Aufnahme der Spektren wird das Spektrophotometer mit einer Ulbricht-Kugel versehen.

Probenvorbereitung

$2,4 \cdot 10^9$ Etioplasten werden in 6 ml Detergenspuffer 2 (2.3.1) aufgenommen, der zusätzlich mit NADPH zu einer Endkonzentration von 1 mM versetzt wird. In der Fraktion Ü3 (2.3.1) wird die NADPH Konzentration von ursprünglich 0,3 mM auf 1 mM erhöht. Die Fraktion EL und die Fraktion mit der MBP-POR werden wie unter Kapitel 2.3.2, respektive 2.4.2 beschrieben, eingesetzt.

Exogene Pigmente (Racemate) werden den pigmentfreien Proben (Fraktion EL) vor der Dialyse in einem molaren Verhältnis Pigment : POR von ca. 2:1 zugeführt.

Dialyse

Aliquote von 3 ml Probenvolumen werden in Dialysekammern (Typ 66380, Pierce) injiziert und diese in einem 1 l Becherglas mit 500 ml 80 % Glycerin-Dialysepuffer bzw. 30 % Glycerin-Dialysepuffer so plaziert, daß die Proben in den Puffer eintauchen. Die Dialyse erfolgt unter leichtem Rühren des Ansatzes in Dunkelheit (4° C) auf einem Magnetrührer. Nach 14 Stunden werden die Proben entnommen. Im Fall des gegen 80 % Glycerin dialysierten Ansatzes wird meist, das durch Wasserentzug reduzierte ursprüngliche Volumen, mit Glycerinpuffer wiederhergestellt. Für eine Kontrolle der Reversibilität der in 80 % Glycerin auftretenden Effekte, wird ein Aliquot dieser Probe gegen einen 30 % Glycerin-Dialysepuffer, wiederum für 14 Stunden, rückdialysiert.

30 % bzw. 80 % Glycerin-Dialysepuffer:

Hepes/KOH, pH 7,2	10 mM
Glycerin	30 bzw. 80 % (v/v)
Tricine	10 mM
EDTA-disodium	0,3 mM
Magnesiumchlorid-hexahydrat	0,3 mM

Verlauf der Photoreduktion

Vor und nach der Dialyse wird die Photoumwandlung in Aliquoten der Proben von 1 ml unter Anwendung möglichst kleiner Belichtungsintervalle spektroskopisch bei Raumtemperatur verfolgt. Die detaillierten Angaben zu den in den Proben enthaltenen Pigmentmengen, den eingesetzten Belichtungsintensitäten und den Belichtungsintervallen sind den Legenden der Abbildungen zu diesen Versuchen in Kapitel 3 zu entnehmen. Sofern sich nach der Photoumwandlung eine Inkubation der Probe im Dunkeln anschließt, erfolgt diese, wenn nicht anderweitig beschrieben, bei Raumtemperatur. Die Dauer dieser Inkubation ist ebenfalls den Legenden der entsprechenden Abbildungen zu entnehmen.

2.8.3.2 Rekonstitutionsversuch - Untersuchung des Lipideinflusses auf die Photoumwandlung

Das Lipid-Pigment-Gemisch wird der Fraktion EL, bzw. der Fraktion mit der MBP-POR in den beschriebenen Konzentrationen (2.7.4) zugesetzt und die Probe für bis zu 40 min im Dunkeln inkubiert. Die weitere Versuchsdurchführung entspricht der Methode unter Punkt 2.8.3.1.

2.8.3.3 Tieftemperatur-Fluoreszenzmessungen zur Energieübertragung zwischen endogenen Pigmenten in 80 % Glycerin

Probenvorbereitung

Drei gleiche Aliquote der Fraktion Ü3 nach Dialyse (2.8.3.1) gegen 80 % Glycerinpuffer, werden vor den Fluoreszenzmessungen zunächst unterschiedlich behandelt und UV/Vis-spektroskopisch untersucht.

Ein Ansatz wird im Dunkeln auf Eis stehen gelassen, einer zweiter Ansatz mit Lichtintensitäten von $3,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in kurzen Belichtungsintervallen (5-20 sec) bis zur vollständig abgeschlossenen Photoreduktion belichtet. Genau die Hälfte beider Proben werden entnommen und vereinigt. Sofort im Anschluß werden 350 μl für die Fluoreszenzmessung eingesetzt.

Das dritte Aliquot wird unter den genannten Bedingungen belichtet, bis genau 50 % der Photoreduktion abgelaufen sind. Dieser Zeitpunkt wird durch Bestimmung der Menge des gebildeten Chlides anhand von Differenz-Absorptionsspektren, im Vergleich zur vollständig belichteten Probe (siehe vorher), ermittelt.

Ein Aliquot von 350 μl wird ebenfalls sofort für die Fluoreszenzmessung herangezogen.

Aufbau der Apparatur

Als Küvette dienen zwei dünne Plexiglas Scheiben (30 x 15 x 1 mm) die durch zwei seitlich verschiebbare Federn an einem Halter fixiert werden. Dieser besitzt an seinem oberen Ende ein Gewinde mit dessen Hilfe er an ein langes Kupferrohr (3,5 x 16,5 cm) verschraubt wird. Federn und Halter sind ebenfalls aus Kupfer. Das Rohr ist innen hohl und wird mit flüssigem Stickstoff aufgefüllt, sobald die Probe in der Küvette und diese mit dem Rohr verschraubt ist. Das Rohr wird in einen Glasdewar (4,2 x 23 cm), der im unteren Drittel mit flüssigem Stickstoff gefüllt ist, eingeführt. Nachdem die Probe vollständig durchgefroren ist, wird das Rohr entnommen und sofort in einen identischen zweiten Glasdewar überführt. Dieser ist mittels Stativen und einem Korkring am Boden des Messraumes des Fluorimeters so fixiert, daß die Küvette genau im Strahlengang liegt und gegebenenfalls nur noch durch leichtes Drehen des Kupferrohres nachjustiert werden muß.

Durchführung

Emissionsspektren werden im Bereich von 580-730 nm, Excitationsspektren von 400 nm bis 500 nm nach Anregung bei unterschiedlichen Wellenlängen aufgenommen. Die Messungen erfolgen unter Verwendung von Kantenfilter (395 nm) bei frontaler Spiegelstellung. Die Spaltbreiten für den Anregungsmonochromator sind 0,5 mm, die hinteren Spaltbreiten betragen 3,5 mm.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Isolierung pigmentfreier POR aus Hafer

Die Isolierung und Aufreinigung der POR aus Etioplasten wird nach Maßgabe folgender Kriterien durchgeführt:

- * Möglichst quantitative Solubilisierung des Enzyms aus den Etioplastenmembranen.
- * Abtrennung eines größtmöglichen Anteils an Fremdprotein.
- * Abtrennung der Pigmente unter Erhalt der Enzymaktivität.

Im Kapitel 3.1.1 steht zunächst die qualitative Beurteilung der erzielten Reinigungserfolge, unter anderem anhand Coomassie gefärbter SDS-Gele im Vordergrund. Der Identitätsnachweis für die POR erfolgt durch Antikörperfärbung (3.1.1.4). Im nachfolgenden Kapitel 3.1.2 wird dann die genaue quantitative Verteilung der Proteine und Pigmente während dieser Aufreinigung vorgestellt. Es folgt im Kapitel 3.1.3 eine Bewertung der spezifischen Aktivität der POR im Aufreinigungsverlauf. Die Ergebnisse der Kapitel 3.1.1 bis 3.1.3 werden abschließend unter 3.1.4 zusammenfassend diskutiert.

3.1.1 Aufreinigung

3.1.1.1 Etioplasten Isolierung

Der Aufschluß der Primärblätter erfolgt in einem isotonischen Medium. Konzentrationen über 0,3 M Sorbit gewährleisten die Stabilisierung intakter Etioplasten. Nach der Filtration des Aufschlusses durch Nylongaze und der Konzentrierung der Plastiden durch Zentrifugation, finden sich jedoch nicht nur intakte Etioplasten im Niederschlag. Bedingt, unter anderem durch mechanische Einflüsse, lysiert ein Teil der Etioplasten. Diese werden ebenso wie andere Zellbruchstücke und Stärke zusammen mit den intakten Plastiden abzentrifugiert. Nach Resuspension des Niederschlages erfolgt eine Abtrennung dieser unerwünschten Komponenten durch Zentrifugation über einen Percoll-Dichtegradienten. Das Ergebnis dieser Auftrennung ist in der Abbildung 08 schematisch wiedergegeben.

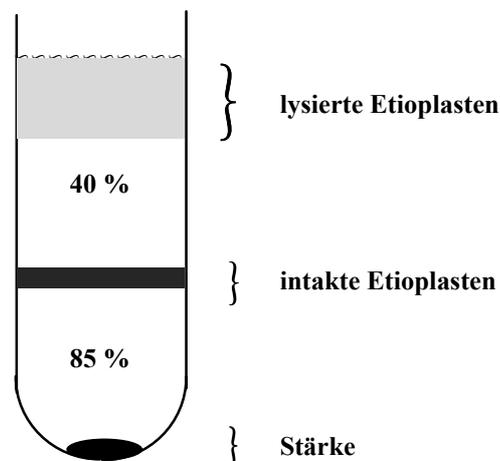


Abb. 08: Vereinfachtes Schema zur Percoll-Dichtegradientenzentrifugation

Intakte Etioplasten konzentrieren sich an der Grenzschicht zwischen 40 % und 85 % Percoll. Lysierte Etioplasten finden sich im oberen Bereich der 40 % Schicht. Der Niederschlag besteht weitgehend aus Stärke.

Verunreinigungen, die beim Abheben der intakten Etioplasten unter Umständen mit aufgenommen werden, verbleiben nach Verdünnung mit isotonischem Puffer und einer abschließenden Zentrifugation im Überstand. Die intakten Etioplasten konzentrieren sich im Niederschlag.

Die Quantifizierung der Plastidenanzahl in einem Hämatocytozometer erfolgt aus Verdünnungen der Suspensionen intakter Plastiden. Unter einem Phasenkontrastmikroskop betrachtet, erscheinen sie in einer rundlich und leicht gewölbter Form. Folgender Mittelwert (\pm Standardabweichung) ergibt sich, bezogen auf das Frischgewicht der für 8 Tage etioliert gewachsenen Haferkeimlinge, nach Auswertung der Plastidenzahlen von 10 Isolierungen:

$14,5 \times 10^8 (\pm 2,4 \times 10^8)$ Etioplasten / 100 g Frischgewicht
--

Die relative Abnahme intakter Etioplasten während des letzten Waschschrilles (2.2.2, Abb. 06), beträgt $5,2 \% \pm 1,2 \%$ (Werte \pm Standardabweichung aus drei Bestimmungen).

Die Abbildung 09 zeigt das Ergebnis einer elektronenmikroskopischen Untersuchung (durchgeführt von Prof. Dr. G. Wanner) von Etioplasten aus vier Tage im Dunkeln gewachsener Gerste, die nach der Methode von Eichacker *et al.* [1996] von Dr. Ingrid Edhofer präpariert wurden. Die im Durchmesser bis zu $3 \mu\text{m}$ großen und von einer Hüllmembran gegen das umgebende Medium abgegrenzten Plastiden sind weitgehend intakt und zeigen die granuläre Stromafraktion, den Prolamellarkörper und die Prothylakoidmembranen.

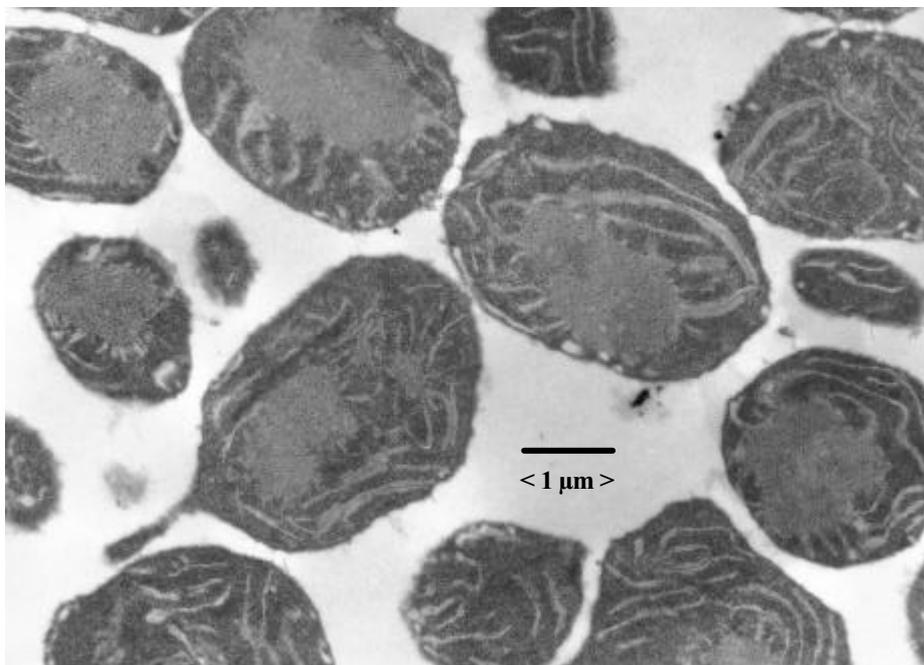


Abb. 09: Elektronenmikroskopische Aufnahme zur Ultrastruktur von Etioplasten

3.1.1.2 Aufreinigung der POR durch differentielle Solubilisierung und Ultrazentrifugation

Das Schema in der Abbildung 10 gibt zunächst einen Überblick über die eingesetzte Methode einschließlich der in Kapitel 3.1.1.3 beschriebenen, abschließenden chromatographischen Reinigung. Die verwendeten Abkürzungen für die Bezeichnung der einzelnen Fraktionen dieser Aufreinigung werden im gesamten Ergebnisteil dieser Arbeit beibehalten.

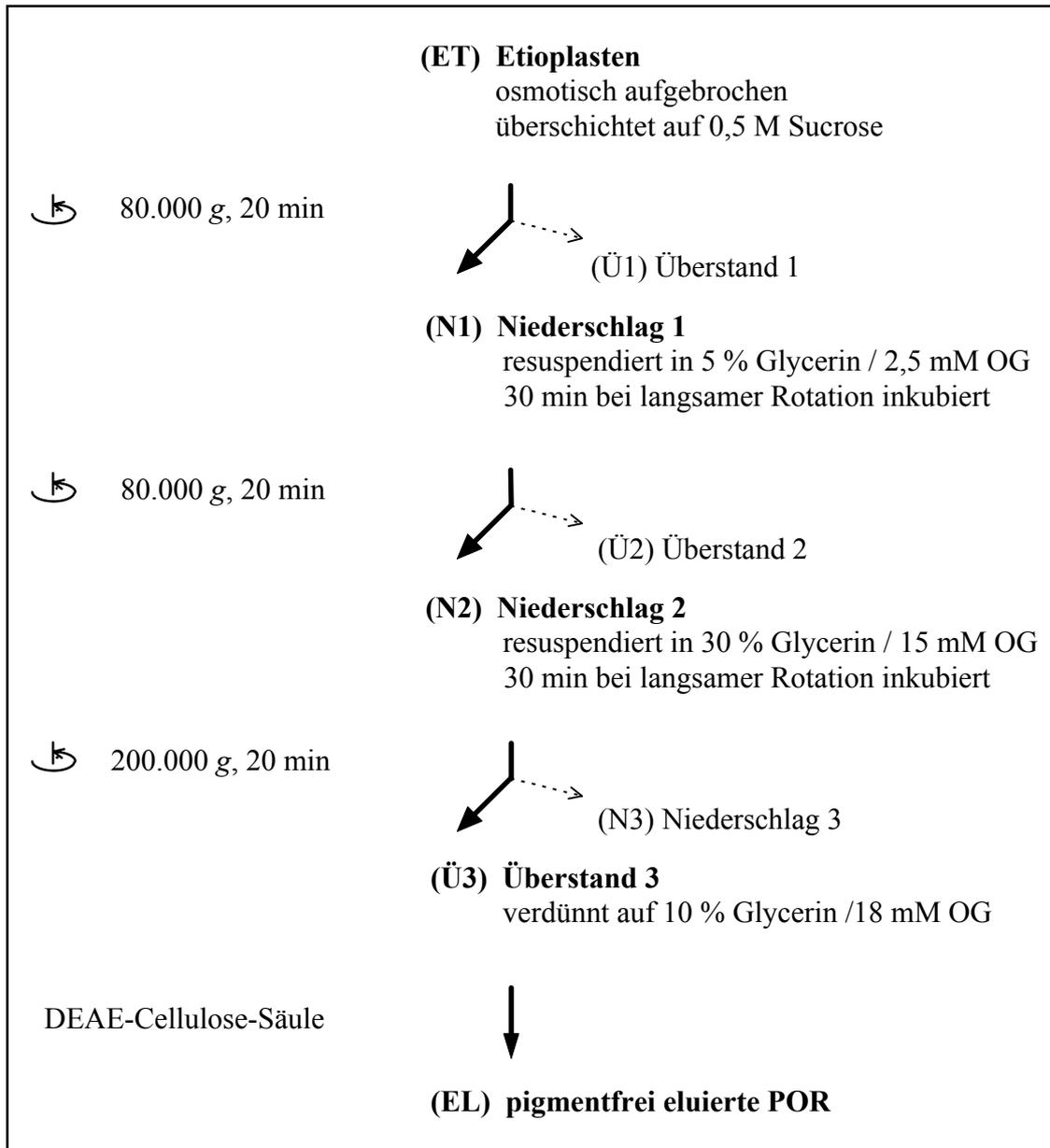


Abb. 10: Vereinfachtes Schema zur Aufreinigung der POR

3.1.1.2.1 Erster Ultrazentrifugationsschritt

Ungefähr $2,4 \times 10^9$ Etioplasten, lysiert in einem 50 mM Tricine-Puffer, werden für diesen ersten Reinigungsschritt pro Zentrifugenröhrchen eingesetzt. Dieser Lysis-Puffer enthält neben der Salzkomponente auch 20 % (v/v) Glycerin. Dadurch wird nachfolgend die Übersichtung eines 0,5 M Sucrose-Puffers mit den lysierten Etioplasten noch möglich. Bei der im Anschluß durchgeführten Sucrose-Dichtezentrifugation verbleibt ein Großteil der stromalen Proteine Überstand. Die POR soll sich im Niederschlag anreichern. Wie aus dem SDS-Gel (Abb. 11) hervorgeht, gelingt dies jedoch noch nicht, wenn die Zentrifugation für 20 min bei nur 39.000 g erfolgt. Eine nicht unwesentliche Menge des Enzyms ist noch im Überstand vorhanden. Durch die Variation des pH-Wertes des Sucrose-Puffers ergibt sich keine Optimierung für die Verteilung der Proteine.

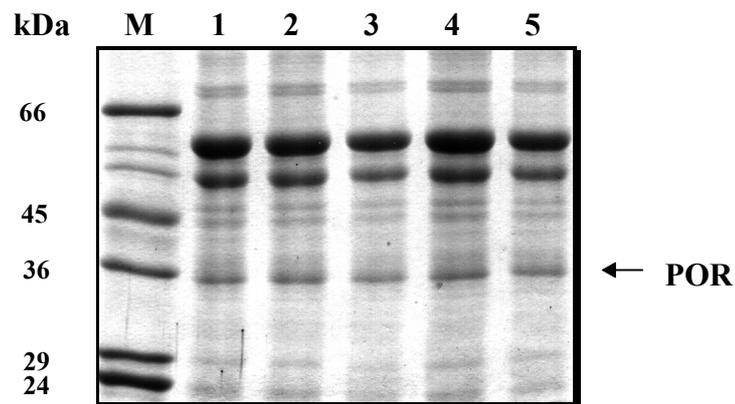


Abb. 11: Überstände nach dem ersten Zentrifugationsschritt bei verschiedenen pH-Werten und 39.000 g

Die Spuren 1 bis 5 zeigen die Fraktion Ü1 bei folgenden pH-Werten für den Sucrose-Puffer: 5,6 (1), 6,0 (2), 6,5 (3), 6,8 (4), 7,2 (5). (M) SDS-7 Markerproteine (siehe auch 2.5.2.1).

Der pH-Wert für den Sucrose-Puffer sowie für alle weiteren nachfolgend verwendeten Puffer wird bei $\text{pH} = 7,2$ gehalten. Nach Griffiths [1978] liegt dieser Wert nahe des pH-Optimums für die Aktivität der POR und wird nach der einschlägigen Literatur mehrheitlich für Untersuchungen zur POR verwendet.

Anhand der Profile einer densitometrischen Bestimmung von Gelausschnitten der entsprechenden Fraktionen (Abb. 12) wird deutlich, daß die Erhöhung der g-Zahl für diesen ersten Ultrazentrifugationsschritt auf 80.000 g, unter Beibehaltung der Zentrifugationszeit von 20 min, nun ausreichend ist um die POR aus der Etioplastenfraktion (Abb. 12 A) quantitativ in den Niederschlag (Abb. 12 C) zu bringen. Im Überstand (Abb. 12 B) sind bei dem entsprechenden rf-Wert (ca. 43 bis 45 mm) nur noch geringe Intensitäten zu beobachten.

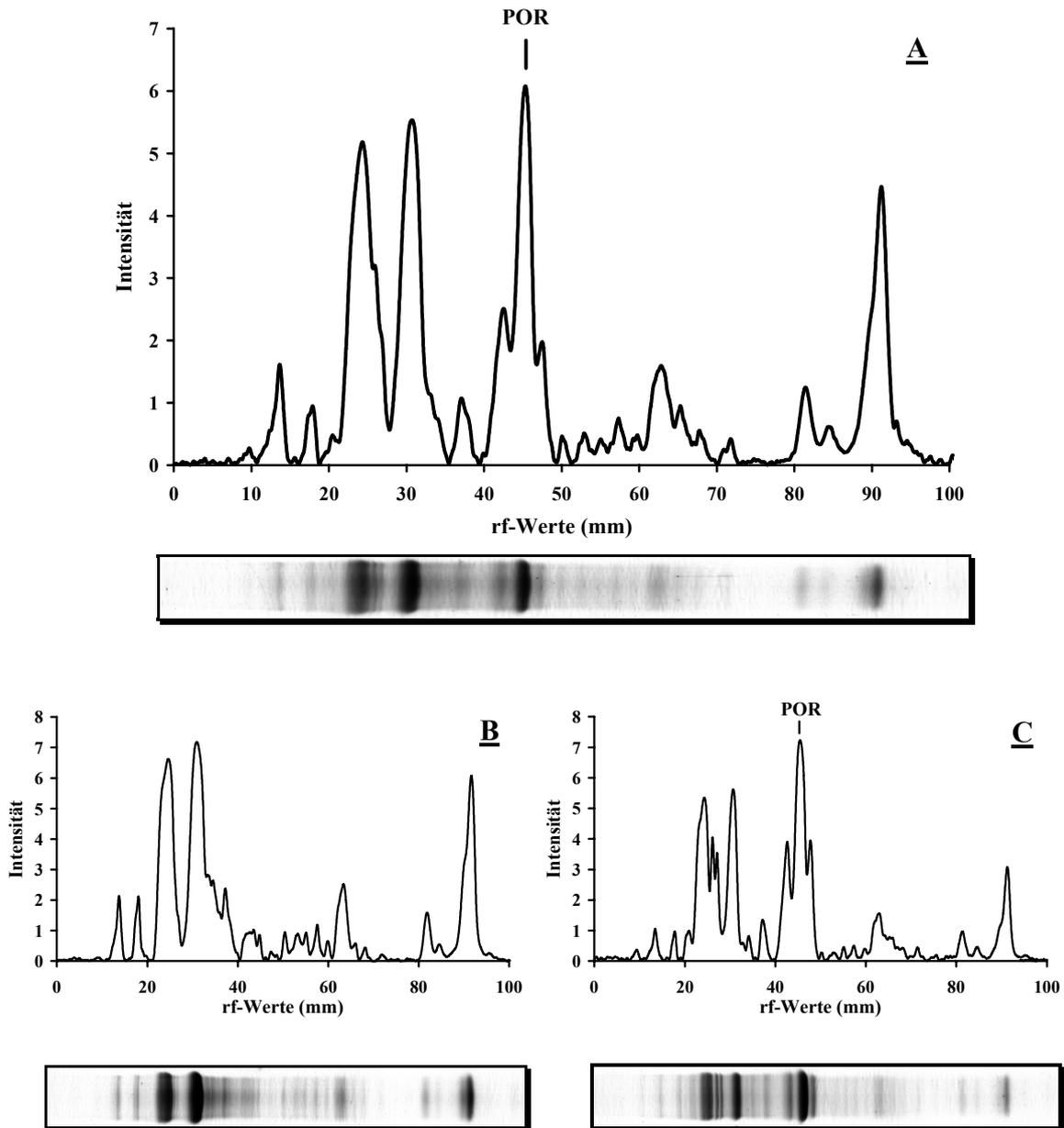


Abb. 12: Qualitative Verteilung der Proteine im Verlauf der ersten Ultrazentrifugation bei 80.000 g Gelausschnitte Coomassie gefärbter SDS-Harnstoff-Gele mit den zugehörigen Profilen der densitometrischen Bestimmung für die Etioplastenfraktion ET (A) vor der Zentrifugation, Überstand Ü1 (B) und Niederschlag N1 (C) nach der Zentrifugation bei 80.000 g für 20 min; aufgetragen sind jeweils 25 µg Protein.

3.1.1.2.2 Zweiter Ultrazentrifugationsschritt

Der Niederschlag der ersten Ultrazentrifugation wird mit Detergens behandelt. Ziel ist die weitgehende Solubilisierung und Abtrennung extrinsischer sowie weiterer löslicher Proteine. Nach einer Zentrifugation bei 80.000 g für 20 min sollten diese im Überstand verbleiben und die POR sich nochmals im Niederschlag anreichern.

Die Verwendung von Triton-X-100 in einer Konzentration von 1 mM ist hierfür nicht geeignet, denn sie bewirkt eine nahezu quantitative Solubilisierung der POR zusammen mit den oben genannten anderen Proteinen. Der Einsatz von n-Octyl-β-D-Glucosid (OG) ist zur weiteren Aufreinigung wesentlich besser geeignet. In Konzentrationen von 5 mM erfolgt ebenfalls bereits eine deutliche Solubilisierung der POR, 2,5 mM OG reichen jedoch nicht aus, um einen großen Teil während 30 minütiger Inkubation in Lösung zu bringen.

Die Glycerinkonzentration im Puffer wird mit 5 % (v/v) ebenfalls bewußt niedrig gehalten, da Glycerin in höherer Konzentration eine Solubilisierung der POR erleichtert [Urbig *et al.* 1995a]. Die Abbildung 13 B macht den Erfolg der nochmaligen Anreicherung des Enzyms im Niederschlag deutlich. Nur Spuren an POR gelangen in den Überstand (Abb. 13 A).

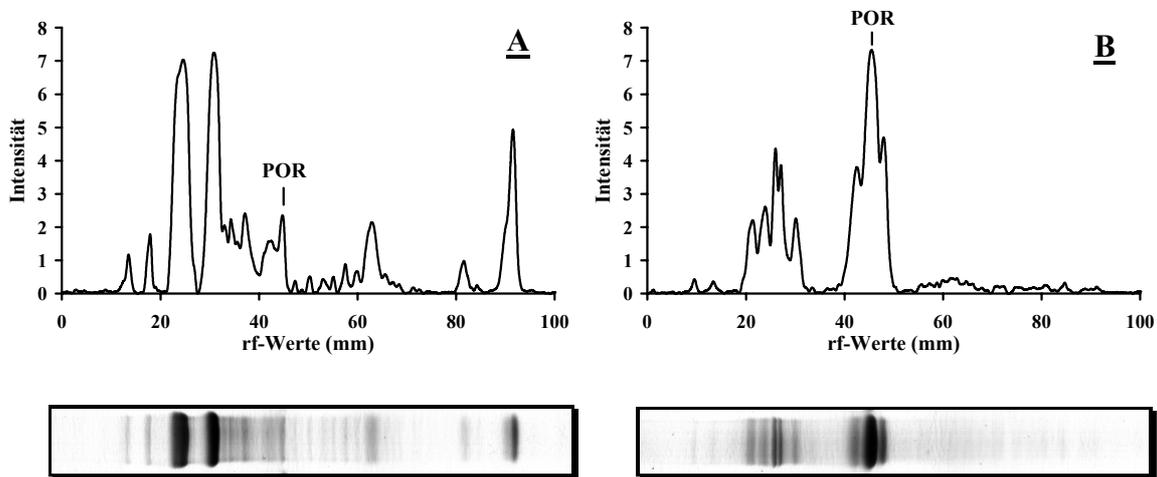


Abb. 13: Qualitative Verteilung der Proteine nach Waschen des Niederschlags N1 mit 2,5 mM OG und erneuter Ultrazentrifugation bei 80.000 g

Gelausschnitte Coomassie gefärbter SDS-Harnstoff-Gele mit den zugehörigen Profilen der densitometrischen Bestimmung für den Überstand Ü2 (A) und den Niederschlag N2 (B) nach der Zentrifugation bei 80.000 g für 20 min.; aufgetragen sind jeweils 25 µg Protein.

3.1.1.2.3 Dritter Ultrazentrifugationsschritt

Die POR, die sich nach der zweiten Ultrazentrifugation im Niederschlag befindet, wird nun durch die Erhöhung der Detergenkonzentration auf 15 mM OG und einer gleichzeitigen Steigerung des Glycerinanteils auf 30 % (v/v) während einer 30 minütigen Inkubation solubilisiert. Selbst bei g -Zahlen von 200.000 g während der folgenden Ultrazentrifugation verbleibt der allergrößte Teil an POR in Lösung (Abb. 14 A). Im Niederschlag (Abb. 14 B) verbleibt im Verhältnis dazu ein relativ hoher Anteil an Fremdproteinen.

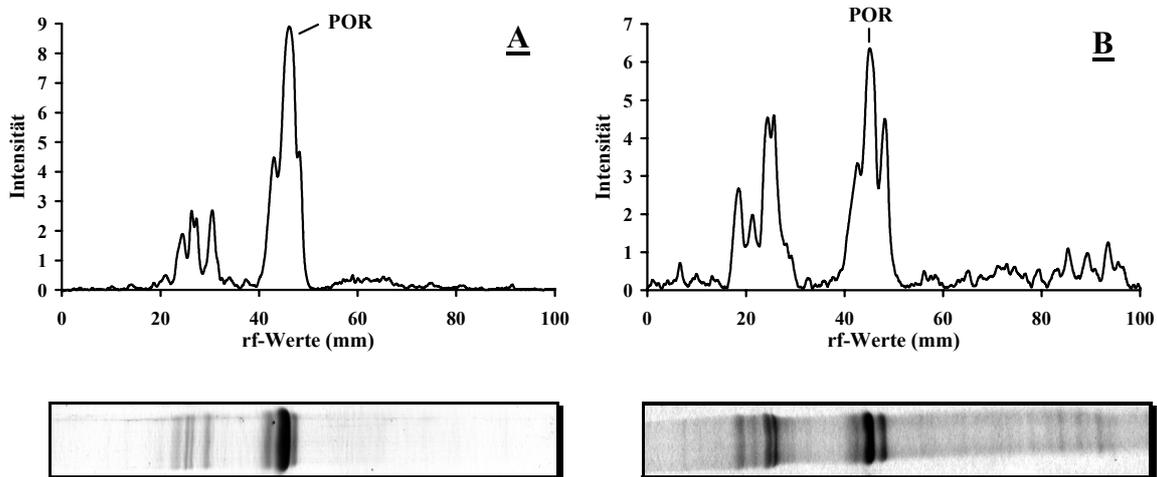


Abb. 14: Qualitative Verteilung der Proteine nach Solubilisierung der POR mit 15 mM OG und Ultrazentrifugation bei 200.000 g

Gelausschnitte Coomassie gefärbter SDS-Harnstoff-Gele mit den zugehörigen Profilen der densitometrischen Bestimmung für den Überstand Ü3 (A) und den Niederschlag N3 (B) nach der Zentrifugation bei 80.000 g für 20 min.; aufgetragen sind 25 μ g Protein (A) von insgesamt 6,25 mg Protein, bzw. 32 μ g Protein (B) von insgesamt 1,98 mg Protein in der Fraktion.

Eine Verlängerung der hier angewendeten Zentrifugationszeit von 20 min auf 120 min bleibt ohne Einfluß. Der Erfolg der Solubilisierung wird zusätzlich bestätigt, wenn man die Konzentrationen an Detergens und Glycerin im Überstand 3 auf 3,75 mM OG / 7,5 % (v/v) Glycerin durch Verdünnen deutlich reduziert und mit dieser Probe eine vierte UZ durchführt. Nach einer Stunde Zentrifugation bei 200.000 g verbleibt nach wie vor die in Abb. 14 A gezeigte Menge an POR vollständig im Überstand.

3.1.1.3 Chromatographische Reinigung der POR unter Abtrennung der Pigmente

Die abschließende Reinigung der solubilisierten POR aus dem Überstand Ü3 des letzten Ultrazentrifugationsschrittes erfolgt mit Hilfe der Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Cellulose. Die entwickelte Methode soll folgende Kriterien erfüllen:

- * Reinigung der POR zur Homogenität unter Erhalt der Enzymaktivität
- * Hohe Ausbeute
- * Abtrennung von Pchlid *a* und Carotinoiden

3.1.1.3.1 Chromatographie

Die OG-Konzentration im Überstand 3 wird zunächst durch Zusatz von Verdünnungspuffer (2.3.2) auf 5 mM, sowie der Glycerinanteil auf 10 % (v/v) gesenkt. Die Probe wird nun auf eine entsprechend äquilibrierte DEAE-Cellulosesäule aufgetragen. Die niedrige Detergengkonzentration verhindert eine Elution der POR von der Säule. Bereits bei 10 mM OG würden hier Verluste auftreten. Entscheidend für den Verbleib der Pigmente auf der Säule ist ein niedriger Glycerinanteil, denn bei 20 % bis 30 % (v/v) Glycerin werden diese nicht mehr auf der Säule gehalten. Nach dem Probenauftrag und dem Durchlauf wird unmittelbar danach die Hauptmenge an POR mit 18 mM OG / 10 % Glycerin (v/v) in 8 ml Puffer eluiert. Auf einen Waschdurchgang vor der Elution wird verzichtet, da die POR nahezu frei von Verunreinigungen durch andere Proteine gewonnen wird (Abb. 15), und eine unnötig lange Verweildauer auf der Säule dem Erhalt der Aktivität des Enzyms, unter diesen Bedingungen (10 % Glycerin) nicht zuträglich ist (siehe auch 3.1.1.3.3). Ein kleiner Teil POR, nun allerdings von geringen Pigmentmengen begleitet, kann durch anschließende Erhöhung der Detergengkonzentration auf 20 mM OG nacheluiert werden.

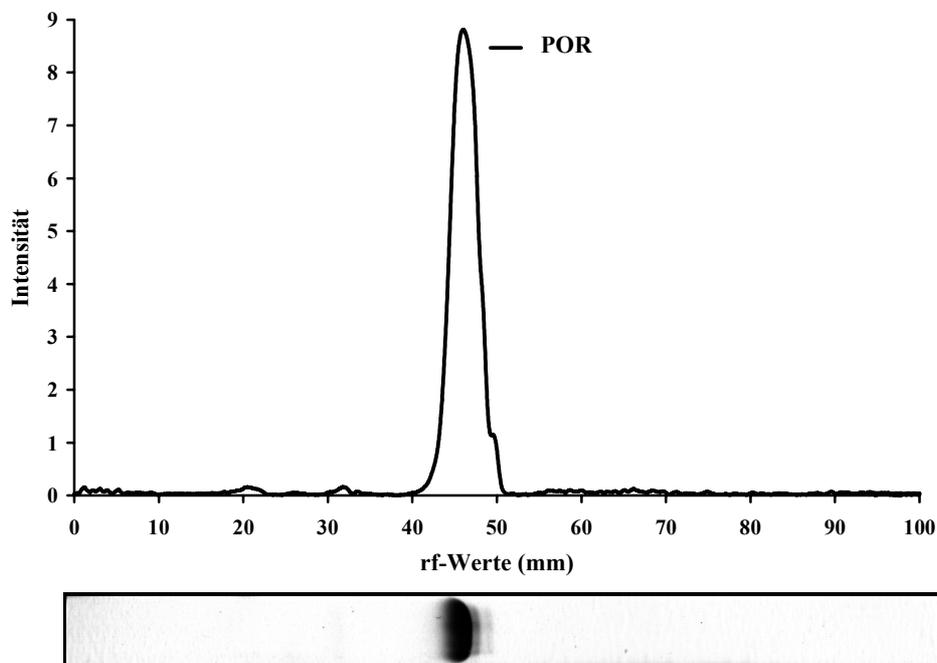


Abb. 15: Gereinigte POR im Eluat nach der Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose. Gelausschnitt eines Coomassie gefärbten SDS-Harnstoff-Gels mit dem zugehörigen Profil der densitometrischen Bestimmung für das Eluat (EL); aufgetragen sind 13 µg Protein.

3.1.1.3.2 Vergleich der pigmentfrei aufgereinigten POR von Hafer und Gerste

Beide isomeren Formen der POR, PORA und PORB konnten bisher nur in Gerste und *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen werden [Übersichtsartikel: Fujita 1996].

Im Verlauf der Aufreinigung ergeben sich für die einzelnen Fraktionen zwischen Hafer und Gerste keine wesentlichen Unterschiede. Davon ausgenommen ist jedoch das pigmentfrei aufgereinigte Eluat nach der Säulenchromatographie. In dem Eluat aus Hafer ist in Coomassie gefärbten SDS-Harnstoff-Gelen neben der POR-Bande bei 36 kDa eine kleine Bande bei 34 kDa erkennbar (Abb. 16 A, Spur 1). Bei dem Eluat aus Gerste fehlt diese 34 kDa Bande, jedoch ist neben der POR-Bande bei 36 kDa eine kleinere zusätzliche Bande bei 38 kDa zu beobachten (Abb. 16 A, Spur 2). Diese 34 kDa, bzw. 38 kDa Banden ergeben ebenfalls eine positive Reaktion mit POR-Antikörpern (Abb. 16 B). In der Literatur wird unter anderem für Gerste das Auftreten zweier isomerer Enzyme, PORA und PORB, mit einem Molekulargewicht von 36 kDa, respektive 38 kDa beschrieben. Es besteht daher die Möglichkeit, daß es sich sowohl bei der hier beschriebenen 38 kDa Bande in Gerste, als auch der 34 kDa Bande in Hafer, um die PORB handelt. Diese 34 kDa Bande könnte jedoch auch durch proteolytischen Abbau entstehen.

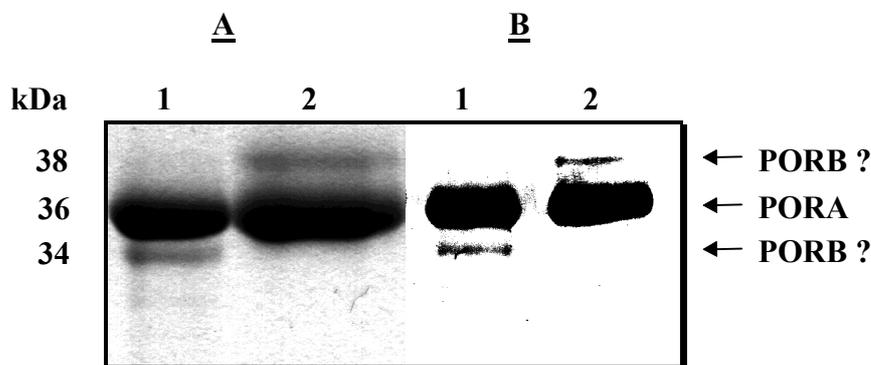


Abb. 16: Vergleich pigmentfrei aufgereinigter POR von Hafer und Gerste
 Coomassie gefärbter SDS-Harnstoff-Gelausschnitt (A) und zugehörige Antikörperfärbung (B); die Spuren (1) zeigen die Eluate aus Hafer, die Spuren (2) die Eluate aus Gerste.

3.1.1.3.3 Aktivität der pigmentfrei aufgereinigten POR

Wird das pigmentfreie Eluat bei 10 % Glycerin (v/v) länger auf Eis gehalten, sinkt die Aktivität, trotz Zugabe von 1 mM NADPH, bereits nach 15 min deutlich. Erhöht man den Glycerinanteil jedoch auf 30 % (v/v), senkt gleichzeitig die OG-Konzentration auf 15 mM ab und setzt wiederum 1 mM NADPH zu, gewährleisten diese Bedingungen den Erhalt der Aktivität für 12 Stunden. Die Probe wird dabei auf Eis gelagert. Hinsichtlich der OG-Konzentrationen ergeben Vergleichsmessungen im Bereich von 5 mM bis 15 mM OG keine nennenswerten Aktivitätsunterschiede. Ab 20 mM OG sinkt die Aktivität jedoch deutlich ab.

Der Zeitraum von 12 Stunden kann durch Zugabe von Pchlid *a* auf 2 bis 3 Tage verlängert werden. Steigert man die Glycerinmenge auf 45 % bis 50 % (v/v), kann die Aktivität durch Lagerung bei - 20 °C für 3 bis 4 Wochen aufrecht erhalten werden. Friert die Probe aufgrund geringerer Glycerinkonzentrationen ein, geht die Aktivität vollständig verloren. Glycerinkonzentrationen über 70 % (v/v) führen ebenfalls zu einem irreversiblen Aktivitätsverlust.

3.1.1.4 Vergleich zwischen Coomassie-, Silber- und Antikörperfärbung

Eine qualitative Übersicht der Aufreinigung der POR, ausgehend von Etioplastenmembranen (ET) aus Hafer bis hin zu dem pigmentfreien Eluat (EL), geben die Abbildungen 17 und 18. Die Silberfärbung (Abb. 18 A) der SDS-Harnstoff-Gele zeigt im Vergleich zur Coomassiefärbung (Abb. 17) die gleichen Proteinbanden, es bestehen jedoch geringfügige Unterschiede hinsichtlich der Intensität der Färbung bei einzelnen Proteinbanden. Die Antikörperfärbung (Abb. 18 B) zeigt deutlich, daß im Überstand Ü1 der Aufreinigung keine POR nachzuweisen ist.

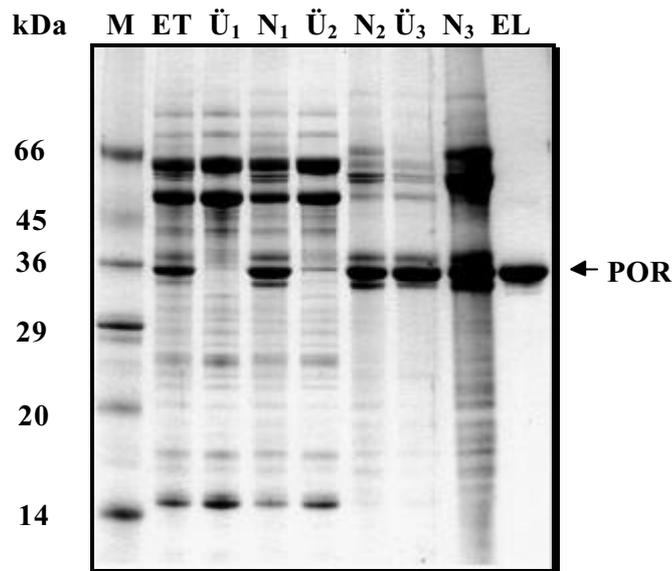


Abb. 17: SDS-Harnstoff-Gel mit den Fraktionen der Aufreinigung - Coomassie gefärbt
 Aufgetragen sind jeweils gleiche Proteinmengen (25 µg) mit Ausnahme der Fraktionen N₃ (52 µg) und EL (13 µg). M = Markerprotein.

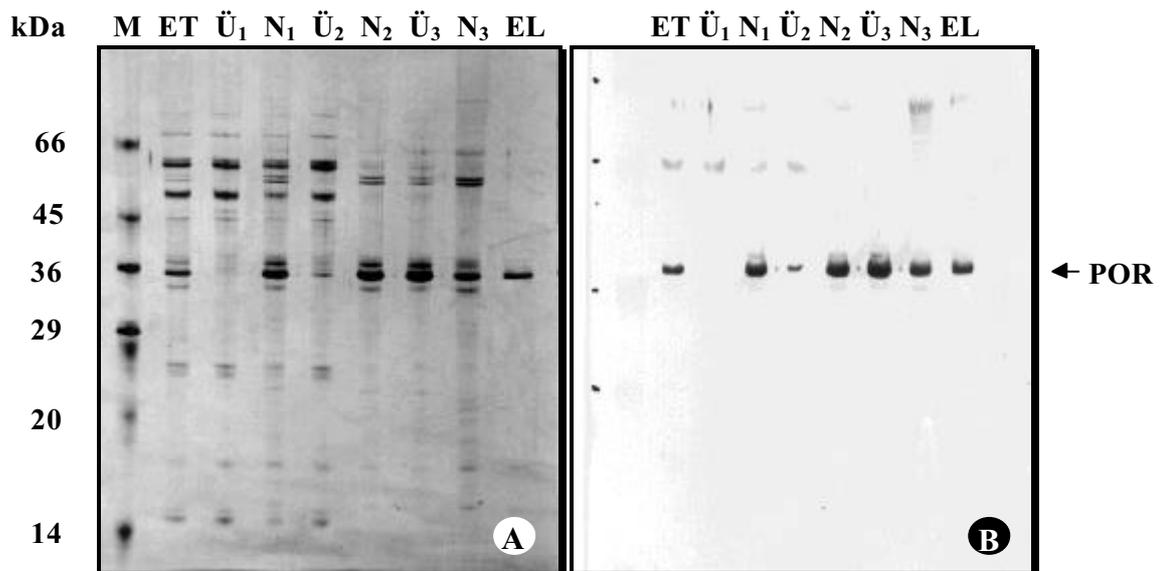


Abb. 18: SDS-Harnstoff-Gel und „Western-Blot“ mit den Fraktionen der Aufreinigung - Silberfärbung (A), Antikörperfärbung (B)
 Aufgetragen sind jeweils gleiche Proteinmengen (2,5 µg) mit Ausnahme der Fraktionen N₃ (3,3 µg) und EL (1,3 µg). M = Markerprotein.

3.1.2 Bestimmung des molaren Verhältnisses von Enzym zu Substrat in Etioplasten

Die im vorangegangenen Kapitel dargestellten rein qualitativen Aspekte der Aufreinigung sollen nachfolgend durch genaue quantitative Auswertungen ergänzt werden. Die gewählte Aufreinigungsmethode kann so einerseits besser beurteilt werden, andererseits ermöglicht die Kombination der nun vorgestellten Verfahren eine Aussage über das molare Verhältnis von Enzym zu Substrat in Etioplasten. Aus diesem Grund werden zunächst die genauen Gesamtprotein- und Pchlid α -Konzentrationen in den einzelnen Fraktionen ermittelt. Densitometrische Auswertungen gescannter, Coomassie gefärbter SDS-Harnstoffgele liefern den prozentualen Gehalt an POR in jeder Fraktion. Diese Daten werden in Relation zur Gesamtproteinmenge der jeweiligen Fraktion gebracht und so rechnerisch die absolute Menge an POR bestimmt. Diese in Verbindung mit der Pchlid α -Konzentration gebracht, ergibt für jede Fraktion ein molares Verhältnis von POR zu Pchlid α .

Sowohl Protein-, Pigment- als auch densitometrische -Analysen können mit methodischen Fehlern behaftet sein. Aus diesem Grund werden fünf Aufreinigungen (Bezeichnung erfolgt als Nr. 1 bis Nr. 5) vorgestellt, aus denen die Ergebnisse zusammengefaßt als Mittelwerte angegeben werden. Die Aussagekraft dieser Mittelwerte wird zusätzlich zu den betreffenden Standardabweichungen durch die graphische Darstellung der Einzelergebnisse für jeden Versuch ergänzt. Variationen zwischen den einzelnen Fraktionen innerhalb dieser Versuche sind so deutlicher erkennbar.

3.1.2.1 Protein- und Pchlide α -Konzentrationen in den Fraktionen der Aufreinigung

3.1.2.1.1 Proteinverteilung

Die Abbildung 19 gibt eine Übersicht von der Verteilung der Gesamtproteinmenge im Verlauf von fünf Aufreinigungen (Nr. 1 bis Nr. 5). Die Auswertung der nach Bradford [1976] durchgeführten Proteinbestimmungen erfolgt anhand der in Punkt 2.5.1 dargestellten Eichkurve (Abb. 07).

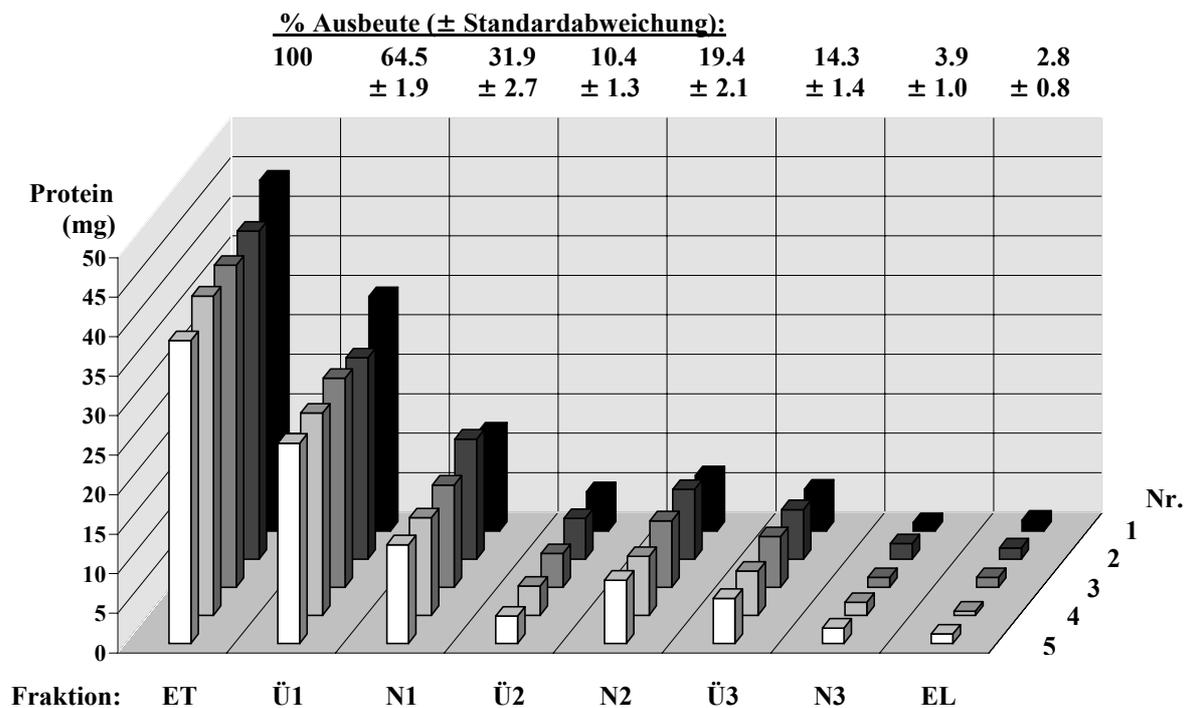


Abb. 19: Proteinverteilung im Verlauf der Aufreinigung

Dargestellt sind die Proteinmengen der einzelnen Fraktionen in fünf Aufreinigungen (Versuche Nr. 1 bis 5). Für die Etioplastenfraktionen ergeben sich dabei folgende Einzelwerte: 44,41 mg (Nr. 1), 41,5 mg (Nr. 2), 40,73 mg (Nr. 3), 40,4 mg (Nr. 4), 38,33 mg (Nr. 5). Die relativen Ausbeuten an Protein für die folgenden Fraktionen Ü1 bis EL, in Relation zu der Proteinmenge in den Etioplasten, sind Mittelwerte aus den prozentualen Ausbeuten, die für jeden einzelnen Versuch bestimmt werden.

Die Graphik verdeutlicht, daß im Vergleich der Versuche miteinander keine großen Differenzen hinsichtlich der Proteinverteilung besteht.

In den Fraktionen Ü1, Ü2 und N3 der Aufreinigungsschritte finden sich ca. 80 % der ursprünglichen Proteinmenge der Etioplasten wieder. Weitere 14 % werden für die weitere säulenchromatographische Reinigung eingesetzt. Die Gesamtproteinausbeute am Ende der Aufreinigung beträgt ca. 3 %.

3.1.2.1.2 Pchlide *a*-Verteilung

In der Abbildung 20 ist die Verteilung der Pchlide *a*-Mengen im Verlauf von fünf Aufreinigungen (Nr. 1 bis Nr. 5) wiedergegeben. Die Bestimmung erfolgt UV/Vis-spektroskopisch nach Extraktion der Pigmente in 80 % Aceton (2.3.3.). Für die Auswertung wird ein millimolarer Extinktionskoeffizient für Pchlide *a* von $\epsilon_{mM} = 30,4$ herangezogen.

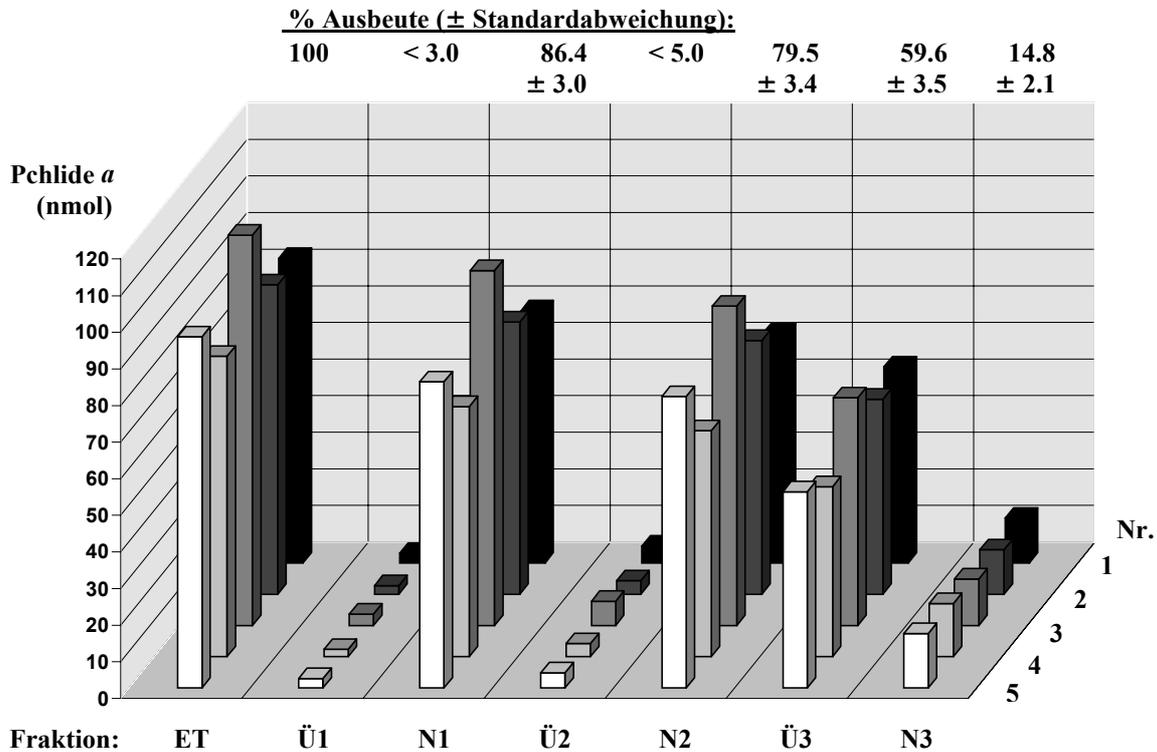


Abb. 20: Pchlide *a*-Verteilung im Verlauf der Aufreinigung

Dargestellt sind die Pchlide *a*-Mengen der einzelnen Fraktionen in fünf Aufreinigungen (Nr. 1 bis Nr. 5). Für die Etioplastenfraktionen ergeben sich dabei folgende Einzelwerte: 83,1 nmol (Nr. 1), 84,5 nmol (Nr. 2), 106,6 nmol (Nr. 3), 82,1 nmol (Nr. 4), 95,9 nmol (Nr. 5). Die relativen Ausbeuten an Pchlide *a* für die folgenden Fraktionen Ü1 bis N3, in Relation zu der Pchlide *a*-Menge in den Etioplasten, sind Mittelwerte aus den prozentualen Ausbeuten, die für jeden einzelnen Versuch bestimmt werden.

Aus der Graphik geht deutlich hervor, daß die Solubilisierung von Pchlide *a* in den ersten beiden Schritten der Aufreinigung (Ü1 und Ü2) sehr gering ist. Die Abnahme an Pchlide *a*, ausgehend von 100 % in den Etioplasten, auf 86 % in der Fraktion N1, bzw. 79 % in der Fraktion N2 kann daher nur auf einen Abbau des Pchlide *a* zurückzuführen sein. Im letzten Schritt, der für die Solubilisierung der POR nötig ist, wird Pchlide *a* in hohem Anteil (59 % der ursprünglichen Menge in Etioplasten) in die Fraktion Ü3 solubilisiert. Nur 15 % verbleiben in der Fraktion N3. Die Fraktion EL ist nicht in die Graphik aufgenommen, da sich hier kein Pigment findet. Vergleicht man die Versuche untereinander, werden für die Versuche Nr. 5 und Nr. 3 gegenüber den anderen deutliche Unterschiede bemerkbar. Die Pchlide *a*-Menge liegt hier bereits von Beginn an etwas höher. Die geringen Standardabweichungen zeigen aber, daß sich innerhalb der einzelnen Versuche nur kleine Abweichungen ergeben.

3.1.2.1.3 Verhältnis von Pchlid α zu Protein in den Fraktionen der Aufreinigung
Bezogen auf die Gesamtproteinmenge, ergibt sich aus den Daten der Pchlid α - und Proteinbestimmungen eine 4-fache Anreicherung von Pchlid α in der Fraktion Ü3 gegenüber der Fraktion ET (Abb. 21).

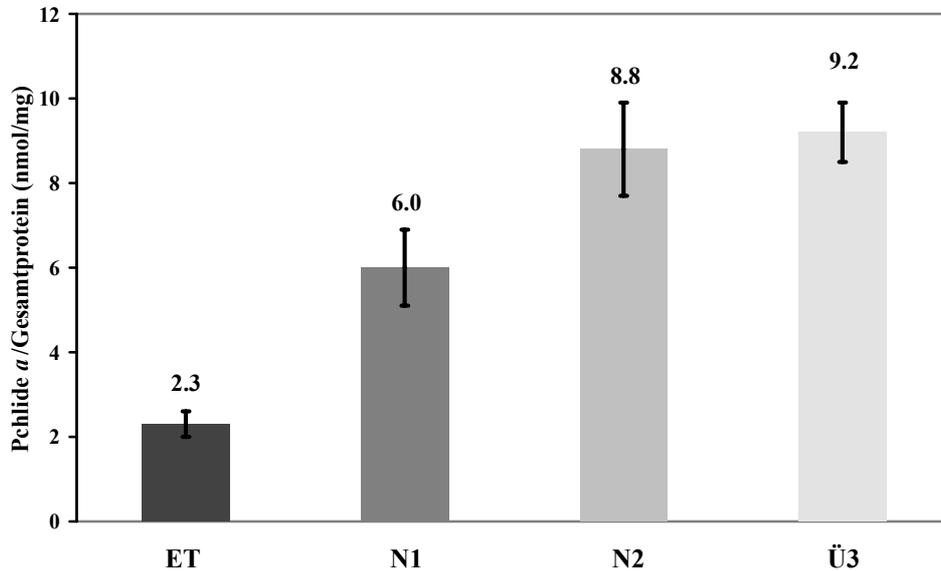


Abb. 21: Verhältnis von Pchlid α zu Protein.

Aus den gezeigten Daten der Proteinbestimmungen (3.1.2.1.1) und Pchlid α - Bestimmungen (3.1.2.1.2) wird für jeden der fünf Versuche das Verhältnis der Pchlid α - zur Proteinmenge in den Fraktionen ET, N1, N2 und Ü3 errechnet. Hier sind die resultierenden Mittelwerte dargestellt, wobei die eingezogenen Balken die jeweilige Standardabweichung wiedergeben.

3.1.2.2 Densitometrische Bestimmung des Anteils an POR in den Aufreinigungsfractionen

Der prozentuale Gehalt der POR wird densitometrisch bestimmt und dieser zu den bekannten Gesamtproteinmengen in Relation gebracht. Aus den so berechneten absoluten Mengen an POR wird einerseits die Ausbeute, andererseits das molare Verhältnis der POR zu Pchlid *a* in den Aufreinigungsfractionen bestimmt.

Der Verlauf der Aufreinigung der im Kapitel 3.1.2.1 beschriebenen fünf Versuche wird anhand Coomassie gefärbter SDS-Polyacrylamid-Gele dokumentiert (typisches Beispiel in Abb. 17). Diese werden im Graustufenmodus mit sehr hoher Auflösung eingescannt und mit einer Gelscan-Software analysiert. Alle gefärbten Proteine einer Gelspur (= Fraktion) werden dabei einzeln erfaßt und die Intensität der Graufärbung vermessen. Die prozentualen Werte für den Gehalt jedes Proteins werden nach Abzug des unspezifisch gefärbten Hintergrundes dieser Gelspur im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt angegeben.

Um verlässliche Daten zu erhalten muß einerseits sichergestellt sein, daß unterschiedliche Mengen an aufgetragenem Gesamtprotein und die dadurch bedingten Abweichungen in den Farbintensitäten für die einzelnen Proteine einer Fraktion, die zu ermittelten prozentualen Werte nicht beeinflussen. Vergleichsmessungen an unterschiedlich aufgetragenen Proteinmengen zeigen, daß Intensitäten (siehe Abb. 12 bis Abb. 15) bis zu einem Wert von 10 zu prozentualen Werten für die Proteine führen, deren Standardabweichung nur bei 0,4 bis 0,6 Prozent liegt. Die Fehler durch unterschiedliche Farbintensitäten sind daher zu vernachlässigen.

Andererseits darf speziell in den Fraktionen ET bis N3 nicht zu wenig Gesamtprotein (< 20 µg) aufgetragen werden, da sonst durch das Fehlen der Färbung von Proteinen, die nur einen sehr geringen prozentualen Anteil am Gesamtprotein haben, die anderen Proteine zu hohe Werte zeigen.

Für die densitometrische Analyse werden für die Auswertung optimale Konzentrationen von 25 µg bis 35 µg Gesamtprotein für die Fraktionen ET bis N3 eingesetzt. Die beste Konzentration für das Eluat mit der gereinigten POR liegt zwischen 10 µg und 15 µg.

3.1.2.2.1 Relativer Gehalt an POR im Verhältnis zum Gesamtprotein

Die Abbildung 22 gibt einen Überblick von dem Grad der Reinheit des Enzyms in den Fraktionen der Aufreinigung.

In der Fraktion Ü1 läßt sich auch durch Antikörperfärbung keine POR nachweisen (3.1.1.4, Abb. 18 B), in Coomassie gefärbten Gelen finden sich jedoch an der selben Stelle (36 kDa) geringe Mengen an Proteinen (3.1.1.2.1, Abb. 12 B). Aus diesem Grund sind die densitometrisch ermittelten, prozentualen Werte von durchschnittlich 10 % für den Gehalt an POR in der Etioplastenfraktion (ET) durch die Überlappung mit diesen Proteinen zu hoch.

Der tatsächliche Wert (8,2 % ± 0,8 %) läßt sich bestimmen, wenn man den densitometrisch bestimmten Wert für die POR in Fraktion N1 in Bezug zur Proteinmenge (mg) dieser Fraktion setzt und über die Proteinmenge (mg) in der Etioplastenfraktion den Wert für die POR in ET errechnet. Diese Korrektur ist möglich, da wie bereits erwähnt, keine POR in der Fraktion Ü1 vorliegt und folglich die POR-Mengen (mg) in der Fraktion ET und N1 gleich sein müssen. Der unten stehenden Graphik (Abb. 22), sowie den nachfolgenden Auswertungen zur Ausbeute (mg) und zum molaren Verhältnis von Enzym zu Substrat liegen die korrigierten Werte zugrunde.

Der relative POR-Gehalt in der Fraktion Ü2 und N3 liegt bei $4.5 \pm 2.0 \%$ bzw. $20.8 \pm 4.4 \%$. Bezogen auf die geringen Gesamtproteinmengen in diesen Fraktionen (Abb. 19) ergeben sich hieraus vernachlässigbar niedrige absolute POR-Gehalte. Diese Fraktionen sind daher nicht in die nachfolgenden Graphiken aufgenommen.

Da nach der säulenchromatographischen Reinigung zwei Proteine mit den Antikörpern reagieren (3.1.1.3.2, Abb. 16), ist für die Fraktion EL ein zweiter Wert (EL_{kor.}) angegeben, der die für die kleiner Bande bei 34 kDa ermittelten Werte mit einbezieht.

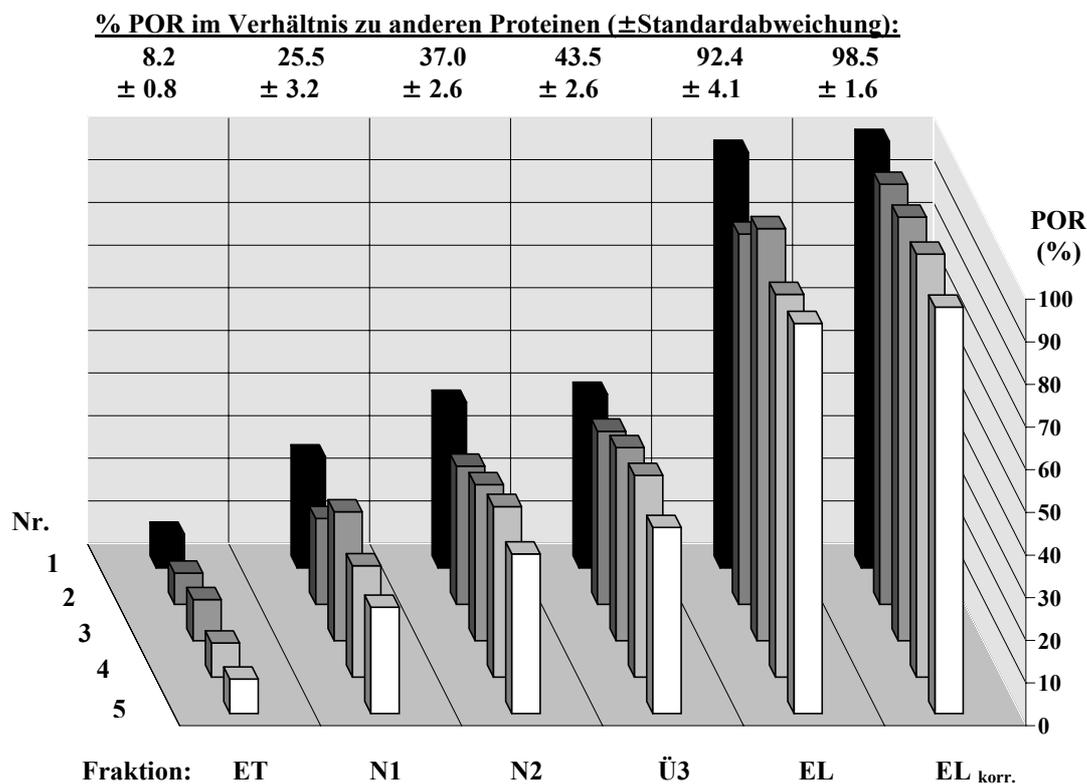


Abb. 22: Prozentualer Gehalt an POR im Verhältnis zur Gesamtmenge der anderen Proteine einer Fraktion

Gezeigt wird der relative Gehalt an POR im Verhältnis zur Gesamtmenge der anderen Proteine der jeweiligen Fraktion. Über der Graphik sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus den Einzelbestimmungen für jeden Versuch (Nr. 1 bis Nr. 5) angegeben.

Die Graphik veranschaulicht, daß die pigmentfreie POR am Ende der Aufreinigung um das 11- bis 12-fache und in der pigmenthaltigen Fraktion Ü3 circa 5-fach reiner als zu Beginn vorliegt. Der letzte Wert stimmt in etwa mit dem Anreicherungsfaktor für Pchlid *a* überein, dessen Berechnung die Daten der Pigment- und Proteinbestimmungen zugrunde liegen (3.1.2.1.3).

Anhand der jetzt berechenbaren absoluten Mengen (mg) kann neben der insgesamt erzielten Ausbeute an Enzym, auch das molare Verhältnis zu Pchlid *a* im Verlauf der Aufreinigung genau ermittelt werden.

3.1.2.2.2 Absolute Mengen an POR (mg) im Verlauf der Aufreinigung und Berechnung der Ausbeute

Der densitometrisch bestimmte prozentuale Gehalt der POR der jeweiligen Fraktion wird in Relation zur Gesamtproteinmenge (mg) gebracht. Der so ermittelte absolute Wert für die Menge (mg) an Enzym wird nachfolgend in die molare Menge umgerechnet. Bei einem Molekulargewicht der POR von 36.000 Da entsprechen 3,6 mg = 100 nmol.

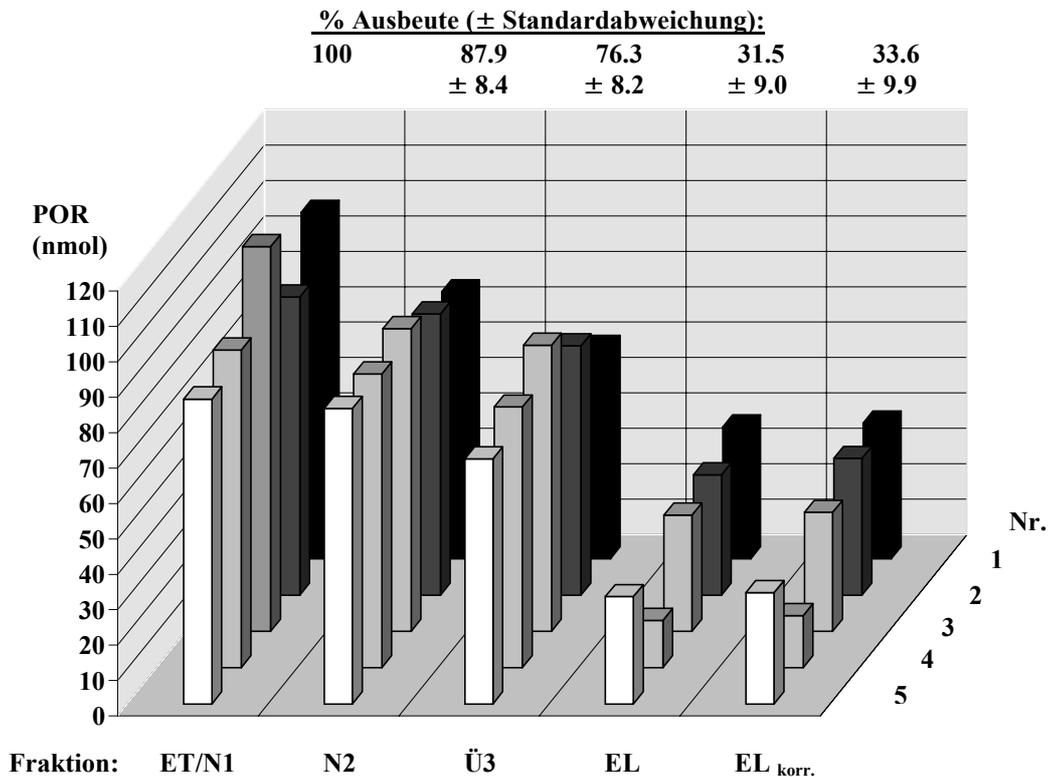


Abb. 23: POR-Gehalt in den Fraktionen der Aufreinigung

Dargestellt sind die POR-Gehalte in den einzelnen Fraktionen der Aufreinigungen (Nr. 1 bis Nr. 5). Für die Etioplastenfraktionen ergeben sich dabei folgende Einzelwerte: 97.8 nmol (Nr. 1), 84.2 nmol (Nr. 2), 108.6 nmol (Nr. 3), 89.7 nmol (Nr. 4), 86.1 nmol (Nr. 5). Die relativen Ausbeuten an Enzym für die folgenden Fraktionen N2 bis EL_{korr.}, in Relation zu der Enzymmenge in den Etioplasten, sind Mittelwerte aus den prozentualen Ausbeuten, die für jeden einzelnen Versuch bestimmt werden.

Anhand der Graphik (Abb. 23) wird deutlich, daß die Ausbeute an pigmentfreier POR am Ende der Aufreinigung bei ungefähr einem Drittel der ursprünglich in Etioplasten vorhandenen Menge liegt.

3.1.2.2.3 Ergebnisse zum molaren Verhältnis zwischen Substrat und Enzym

Die Abbildung 24 verdeutlicht, daß das molare Verhältnis von Pchlid *a* zur POR in den Fraktionen mit steigender Anreicherung des Enzyms relativ konstant nahe 1 bleibt. Die POR und Pchlid *a* werden also zusammen aufgereinigt, wobei nur geringe Verluste an Pchlid *a* auftreten. Der Pchlid *a*-Gehalt des Enzymkomplexes in Etioplasten ist mit einem Molekül Pchlid *a* pro Molekül POR anzugeben.

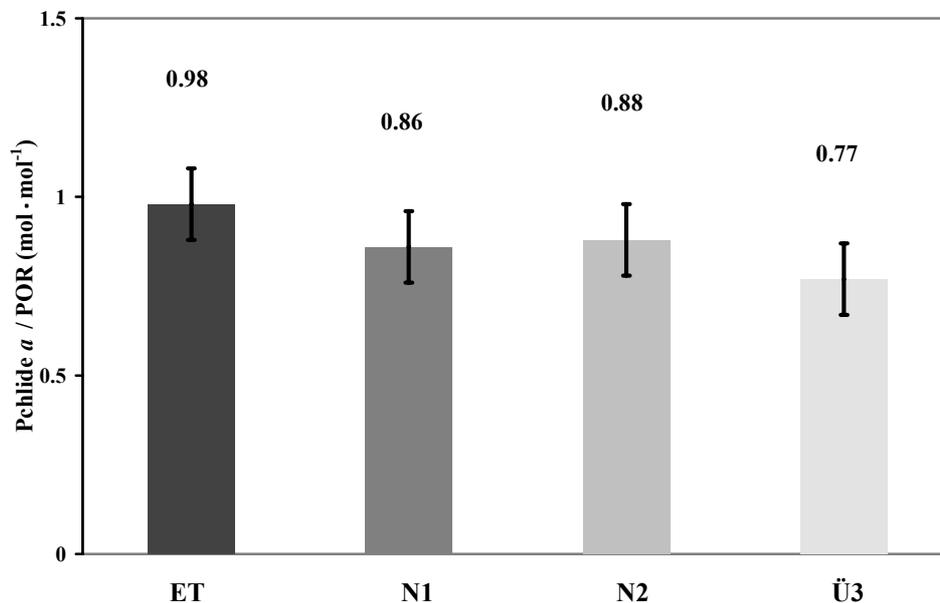


Abb. 24: Molares Verhältnis zwischen Pchlid *a* und POR

Die Ergebnisse der Pchlid *a*-Bestimmungen (Abb. 20) und die Ermittlung der Enzymmengen (Abb. 23) aus fünf Versuchen werden zueinander in Relation gebracht. Hierbei ergeben sich für die angeführten Fraktionen der Aufreinigung die dargestellten Mittelwerte. Die eingezogenen Balken zeigen die jeweilige Standardabweichung.

3.1.3 Spezifische Aktivität der POR im Verlauf der Aufreinigung

Ein entscheidender Maßstab für die Beurteilung der Qualität einer Methode zur Enzymaufreinigung ist, neben der erzielbaren Reinheit und der Ausbeute an Protein, der Erhalt der Aktivität des Enzyms. Inwieweit Verluste an Aktivität bei der vorgestellten Aufreinigung in Kauf genommen werden müssen, soll die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten klären.

In Etioplasten und in den Fraktionen mit angereicherter POR (N1, N2, Ü3 und EL) werden nach Blitzlichtbelichtung die gebildeten Mengen an Chlid *a* pro Blitz bestimmt und in Relation zur Gesamtproteinmenge der Fraktion gesetzt. Innerhalb der ersten drei Belichtungen ist ein linearer Anstieg der Chlid *a*-Menge zu beobachten. Bereits nach dem ersten Blitz sind circa 15 % des gesamten Substratumsatzes abgeschlossen. Dieser Wert wird für die Auswertung herangezogen. Bis zur vollständigen Reduktion des Pchlid *a*, nach ungefähr 20 Blitzen, nimmt der Anstieg dann exponentiell ab.

Die spezifische Aktivität in dem pigmentfreien Eluat (EL) kann selbstverständlich nur mit exogen zugeführtem Pchlid *a* ermittelt werden. Um nun vergleichbare Aussagen zu erhalten, erfolgt die Bestimmung der spezifischen Aktivität in den anderen Fraktionen sowohl anhand der vollständigen Reduktion von endogenem Pigment, als auch im Anschluß daran durch

Zugabe und Umwandlung von exogenem Pchlid *a*. In zwei Versuchen dieser Art ergibt sich dabei kein Unterschied zwischen den Werten für beide Formen.

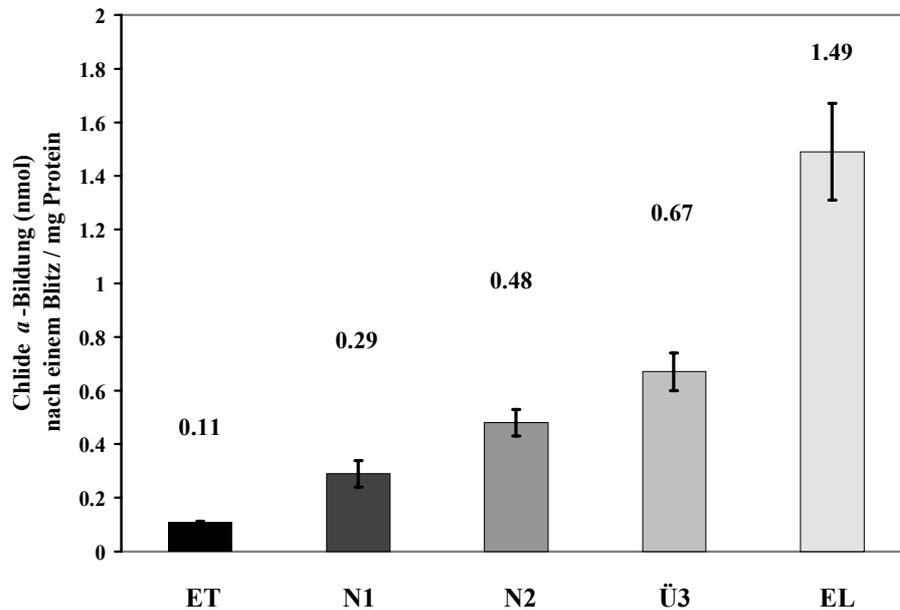


Abb. 25: Spezifische Aktivität

Die Daten zeigen Mittelwerte aus drei Aufreinigungen. Die gebildete Chlide *a*-Mengen nach der ersten Blitzlichtbelichtung werden auf 1 mg Protein bezogen. Die Standardabweichungen sind durch eingezogene Balken gekennzeichnet. Die Testansätze enthalten in jeder Fraktion je $1 \text{ nmol} \cdot \text{ml}^{-1}$ Pchlid *a*. Die Gesamtproteinmengen in den Fraktionen verteilen sich im Durchschnitt wie folgt: $484 \pm 15 \mu\text{g}$ (ET), $188 \pm 11 \mu\text{g}$ (P1), $123 \pm 9 \mu\text{g}$ (P2), $103 \pm 8 \mu\text{g}$ (Ü3) und $39 \pm 3 \mu\text{g}$ (EL).

Die Graphik (Abb. 25) macht den Anstieg der spezifischen Aktivität im Verlauf der Aufreinigung deutlich. Setzt man die spezifische Aktivität in der Etioplastenfraktion gleich 1, erhöht sich diese bis hin zum Eluat um das 13,7-fache. Verfährt man mit dem in Punkt 3.1.2.2.1 (Abb. 22) bestimmten Anstieg des Reinheitsgrades der POR in den vergleichbaren Fraktionen ebenso, ergeben sich sehr ähnliche Faktoren. Die folgende Abbildung 26 stellt diesen Vergleich dar.

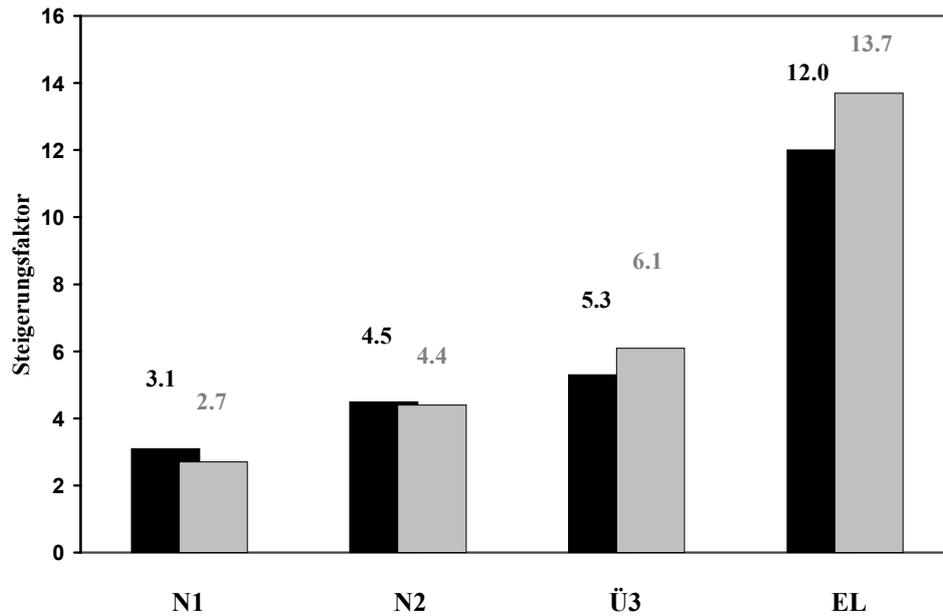


Abb. 26: Vergleich der Steigerungsfaktoren der spezifischen Aktivität (grau) mit denen des Reinheitsgrades der POR (schwarz) im Verlauf der Aufreinigung

Die angegebenen Faktoren beziehen sich auf die Etioplastenfraction, deren Faktoren gleich 1 gesetzt sind.

Man sieht, daß die Steigerung der spezifischen Aktivität relativ gut mit dem bestimmten Reinheitsgrad korreliert. Je höher der Anteil an POR am Gesamtprotein in den jeweiligen Fraktionen ist, desto stärker nimmt die spezifische Aktivität im Vergleich zur Steigerung des Reinheitsgrades zu.

3.1.4 Diskussion

Die POR akkumuliert in Angiospermen während der Skotomorphogenese (Entwicklung der Keimlinge bei Wachstum in Dunkelheit - „Etiolierung“; [McNellis & Deng 1995]) in den aus Proplastiden hervorgehenden Etioplasten. Innerhalb dieser Plastiden ist die POR als ternärer Komplex zusammen mit dem Coenzym NADPH und dem Substrat Pchlide *a* [Griffiths 1978] überwiegend in „parakristallinen“ Membranstrukturen, den Prolamellarkörpern („Prolamellar bodies“ - PLB's) lokalisiert [Ryberg & Dehesh 1986]. In Verbindung zu diesen sehr kompakten Strukturen stehen weitläufige Membransysteme, die Prothylakoide (PT's). Die ersten Versuche zur Isolierung der POR aus Pflanzenmaterial fanden bereits vor über 40 Jahren statt [Krasnovsky & Kosobutskaya 1952, Smith & Kupke 1956]. Seither wurden viele Anstrengungen unternommen dieses Enzym unter Erhalt der Aktivität zu reinigen. Die in dieser Arbeit vorgestellte unkomplizierte Methode (schematische Übersicht in Abb. 10) ermöglicht die Reinigung aktiver POR zur Homogenität.

Den Ausgangspunkt für die Aufreinigung der POR aus etioliertem Hafer, respektive Gerste, bildete die Isolierung intakter Etioplasten. Hierbei wurde ein Verfahren angewendet (schematische Übersicht in Kapitel 2.2.2, Abb. 07), das im wesentlichen auf der Methode von Eichacker *et al.* [1996] basiert. Den zentralen Bestandteil bildet die weitgehende Abtrennung unerwünschter Komponenten (lysierte Etioplasten, Zellbruchstücke, Stärke) durch eine Percoll-Dichtegradientenzentrifugation (Abb. 09). Diese Reinigungsmethode ist speziell für die Etioplastenpräparation aus Hafer von besonderer Bedeutung, denn Haferkeimlinge enthalten größere Mengen Steroid-Saponine [Lütz & Klein 1979, Kesselmeier & Budzikiewicz 1979]. Sie sind keine integralen Bestandteile der Etioplasten [Kesselmeier 1982] und lassen sich bei Verwendung von Percoll-Dichtegradienten abtrennen [Ikeuchi & Murakami 1983].

Die Überlegung als Ausgangsmaterial für die Aufreinigung der POR aus den Etioplasten, das Enzym zunächst durch eine saubere Isolierung der PLB's anzureichern, wurde verworfen. Ryberg & Sundqvist [1982 a] versuchten die beiden inneren Membransysteme der Etioplasten (PLB's und PT's) über Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation getrennt voneinander zu isolieren. Den Autoren gelang dabei nur eine partielle Trennung. Ikeuchi & Murakami [1983] konnten dagegen über differentielle Zentrifugation und Percoll-Dichtegradientenzentrifugation schon weitgehend sauber getrennte Membranfraktionen aus Spinat-Etioplasten gewinnen. Beide Methoden bringen einen hohen zeitlichen Mehraufwand mit sich, der im Hinblick auf eine schnelle und damit schonende Aufreinigung nicht gerechtfertigt ist.

Unter diesem Gesichtspunkt ergab insbesondere die von Apel *et al.* [1980] vorgestellte Methode einen vielversprechenden Ansatz für die Isolierung der POR, da hier eine mit PLB's angereicherte Fraktion in nur einem Arbeitsgang aus den Etioplasten gewonnen werden konnte. Im wesentlichen wurde dieser erste Arbeitsgang daher übernommen. Dabei wurden lysierte Etioplasten auf Sucrose überschichtet und deren Fragmente mit der POR nach einer Ultrazentrifugation im Niederschlag konzentriert. Es zeigte sich jedoch, daß die von den Autoren verwendete *g*-Zahl nicht optimal ist, da ein Großteil der POR in den Überstand gelangt (Abb. 11) und somit für die weitere Aufreinigung verloren geht. Durch eine Variation des pH-Wertes konnte kein Einfluß auf das Zentrifugationsverhalten festgestellt werden. Der von Apel *et al.* verwendete pH von 7,2 wurde für diesen, sowie für alle nachfolgenden Schritte der Aufreinigung beibehalten. Dieser Wert liegt nahe dem pH-Optimum für die Aktivität der POR in PLB's aus Gerste [Griffiths 1978]. Eine deutliche Optimierung der Ausbeute für die POR ist bei diesem ersten Zentrifugationsschritt erst durch die deutliche Erhöhung der *g*-Zahl gelungen (Abb. 12 B und C). Während das Enzym nun quantitativ in den

Niederschlag gelangt, kann im Überstand eine beachtliche Menge löslicher Proteine abgetrennt werden.

Von entscheidender Bedeutung für den Erfolg der weiteren Reinigung der POR, unter Berücksichtigung des Erhaltes der Aktivität, ist eine möglichst selektive und quantitative Solubilisierung des Enzyms aus der Membranumgebung der PLB's und PT's.

Die genaue Art und Weise der Verankerung der ternären Komplexe an oder in den Membranen ist dabei noch nicht bekannt. Selstam & Widell-Wigge [1989], sowie Grevby *et al.* [1989] schließen aus Phasenverteilungsexperimenten, respektive Membranwaschungsversuchen, daß die POR in den Membranen integral verankert ist. Wenngleich ein großer Anteil der Aminosäuren der POR hydrophob ist [Röper *et al.* 1987], so zeigen Hydrophobizitäts-Blots an der Sequenz jedoch keine hydrophoben Segmente, die lang genug wären, eine membranspannende α -Helix zu bilden [Benli *et al.* 1991]. Die POR kann demnach kein integrales Membranprotein sein. Die Ergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen deuten auf eine mehr oder minder starke Assoziation des Enzyms an das Membransystem hin [Griffiths & Oliver 1984, Widell-Wigge & Seltstam 1990]. Urbig *et al.* [1995a] schließen aus Solubilisierungsversuchen und Hydrophobizitätstests mit Triton-X-114 an der POR aus PLB's der unicellulären Alge *Scenedesmus obliquus*, daß die POR als hydrophobes Protein an die Membran assoziiert, jedoch kein integrales Membranprotein ist. Birve *et al.* [1996] schlagen eine mögliche Verankerung des Enzyms in der interfacialen Region der Membran vor.

Von Smith [1956], wurden die ersten, bis dato aus Bohnen isolierten löslichen und photoaktiven Komplexe [Krasnovski & Kosobutskaya 1952], sowie der von ihm isolierte Komplex mit einem Molekulargewicht von ungefähr 400 kDa, als „Protochlorophyllid Holochrom“ bezeichnet. Bis zu Beginn der 70`er Jahre, konnten mit verschiedenen Isolierungsmethoden, unter anderem über Ammoniumsulfatfällung und nachfolgender Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation [Boardman 1962] und auch schon erstmals unter der Verwendung von Triton-X-100 als Detergens [Schopfer & Siegelman 1968] nur hochmolekulare Komplexe mit einem Molekulargewicht von mindestens 300 kDa isoliert werden. Über eine elektrophoretische Trennung an Polyacrylamid-Gelen und durch Fluoreszenz-Pigmentanalysen fanden Canaani & Sauer [1977] in Präparationen aus Bohnen ein Pigment-bindendes Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 45 kDa. Redlinger & Apel [1980] fanden in Gerste vier Pchlide-Bindeproteine mit Molekulargewichten von 70, 41, 17 und 14 kDa.

Hennigsen *et al.* [1971] isolierten erstmals unter Verwendung von Saponin als Detergens, photoaktive Komplexe mit einem Molekulargewicht von ungefähr 60 kDa (Gerste), bzw. 170 kDa (Erbse). Mapleston [1978] konnte aus Hafer über die Solubilisierung mit diesem Detergens und nachfolgender Gelfiltration keine aktive POR mit geringem Molekulargewicht isolieren.

Dies gelang später Beer & Griffiths [1981] mit Triton-X-100 (4 mM). Die zwei dabei isolierten Polypeptide mit Molekulargewichten von 35 kDa, respektive 37 kDa zeigten nach Zusatz von exogenem Pchlide *a* und NADPH Aktivität. Ebenfalls Triton X-100 (1 mM) setzte Apel *et al.* [1980] für die Solubilisierung der POR aus Gersten PLB's ein. Sowohl hier als auch bei der weiteren Aufreinigung über DEAE-Ionenaustauschchromatographie konnte ein Erhalt der Aktivität nur durch Zugabe von NADPH und exogenem Pchlide *a* erreicht werden. Das Molekulargewicht der isolierten POR lag bei 36 kDa. Auch Ikeuchi & Murakami [1982] konnten später zeigen, daß sowohl NADPH als auch Pchlide *a* bei Verwendung von Triton-X-100 von der POR abgelöst werden.

Eine starke Abnahme der Aktivität (63 %) beobachteten Richards *et al.* [1987] bei der Verwendung des zwitter-ionischen Detergens CHAPS (4 mM) zur Solubilisierung der POR aus Weizen Etioplasten.

Stubbs *et al.* [1976] sowie Wiktorsson *et al.* [1992] stellten dagegen fest, daß nicht-ionische Glucoside, speziell Octylglucoside, nur sehr moderate denaturierende Eigenschaften aufweisen. In einem Vergleich zwischen Triton-X-100, CHAPS und OG stellten Urbig *et al.* [1995b] an Solubilisierungsexperimenten mit PLB's aus *Scenedesmus obliquus* die größte Steigerung der POR-Aktivität bei der Verwendung von OG fest. Aus diesem Grund wurde für die Solubilisierung der POR das Detergens OG gewählt.

Neben dessen Einfluß spielt jedoch eine weitere Komponente bei der Aufreinigung der POR eine wesentliche Rolle.

Bereits Smith & Ahrne [1955] sowie Butler & Briggs [1966] konnten bei *in vitro* Studien an Gerste einen stabilisierenden Effekt von Glycerin auf den Erhalt der Photoaktivität beobachten. Bei Zusatz von 30 % Glycerin zu PLB-Membranenpräparationen aus Bohnen, sowie 60% Glycerin zu isolierten „Protochlorophyll Holochrom“ Präparationen stellten auch Kahn *et al.* [1970] derartige Effekte fest. 43 % Glycerin verwendeten aus gleichem Grund Henningsen & Kahn [1971] bei PLB- und Brodersen [1976] bei Etioplastenpräparationen aus Gerste. Apel *et al.* [1980] bemerkten einen Aktivitätsverlust bei solubilisierter POR, wenn bei der Aufreinigung des Enzyms über einen Glyceringradienten die Glycerinkonzentration von 20 % auf 7,5 % gesenkt wurde. Bei der Präparation von PLB's aus unicellulären Algen, die strukturell denen aus höheren Pflanzen sehr ähnlich sind [Wellburn *et al.* 1980], konnten Urbig *et al.* [1995 a,b] zeigen, daß 30 % Glycerin bereits ohne die Gegenwart von Detergens einen starken positiven Einfluß sowohl auf die Aktivität, als auch auf die Solubilisierung der POR aus den PLB's hat.

Die stabilisierenden Eigenschaften des Glycerins in Verbindung mit der „milden“ denaturierenden Wirkung des Detergens OG stellen die Basis für die hier angewendete Methode der differentiellen Solubilisierung dar. Diese verläuft in zwei Schritten.

Im ersten Schritt konnten lösliche Proteine mit einer niedrigen Detergengkonzentration solubilisiert (Fraktion Ü2), und durch Ultrazentrifugation von der POR abgetrennt werden (Abb. 13 A). Die POR blieb zusammen mit integralen Membranproteinen zum allergrößten Teil in dem Niederschlag (N2) (Abb. 13 B). Die Glycerinkonzentration wurde während dieses ersten Schrittes noch bewußt niedrig gehalten, da die Aktivität der nicht solubilisierten POR durch die Einbettung des ternären Komplexes in die Membranumgebung aufrechterhalten wird.

Es hat sich gezeigt, daß bei einer Erhöhung der OG-Konzentration die Solubilisierung der POR deutlich zunimmt. Höhere Konzentrationen (10 mM OG) führen nach Wiktorsson *et al.* [1992] zu einer schonenden Solubilisierung der POR aus PLB's von Weizen.

In dem nun folgenden zweiten Schritt wurde die POR daher nahezu quantitativ mit einer hohen OG-Konzentration aus dem Niederschlag (N2) solubilisiert. In der abschließenden Ultrazentrifugation bleibt das Enzym in Lösung (Ü3) (Abb. 14 A), während der Niederschlag (N3) mit integralen Membranproteinen angereichert ist (Abb. 14 B). Die Glycerinkonzentration wurde erhöht, einerseits um die Solubilisierung zu unterstützen, aber in erster Linie um die Aktivität des solubilisierten Enzyms aufrecht zu halten, nachdem es aus der schützenden Membranumgebung entfernt worden ist.

Diese Methode der differentiellen Solubilisierung der POR aus Etioplasten ist sehr schnell und unkompliziert durchzuführen, was besonders dem Erhalt der Aktivität zu Gute kommt. In den Fraktionen der Aufreinigung, in denen sich die POR zunehmend anreichert (Abb. 22) steigt die spezifische Aktivität gegenüber der Ausgangsfraktion (Etioplasten; ET) fortlaufend an (Abb. 25) und erreicht in der Fraktion Ü3 schließlich eine ca. 6-fache Steigerung (Abb. 24). Eine Zugabe von NADPH oder insbesondere von exogenem Pigment war für den Erhalt der Aktivität im Gegensatz zu früheren Methoden [Apel *et al.* 1980] nicht erforderlich. Birve *et al.* [1996], die zur Solubilisierung der POR aus PLB-Präparationen von Weizen Genapol X-080 einsetzten, konnten ähnliche Erfolge erzielen. Die mit diesem Polyethylenglycolether solubilierte Fraktion zeigt eine 1,8-fache Steigerung der spezifischen Aktivität gegenüber den PLB-Membranen. Diese ist vergleichbar mit einer 2,3-fachen Steigerung der spezifischen Aktivität der Fraktion Ü3 gegenüber der Fraktion N1 (Abb. 25). Der densitometrisch bestimmte Reinheitsgrad der POR steigt während der Aufreinigung bis zur Fraktion Ü3 von ca. 8 % in den Etioplasten über ca. 25 % in der Fraktion N1 und 37 % in der Fraktion N2 auf gut 43 % (Abb. 22). Birve *et al.* [1996] können den ebenfalls densitometrisch bestimmten Gehalt an POR, in der mit Ü3 vergleichbaren Fraktion, mit 54 % angeben.

Der lineare Zusammenhang zwischen der Steigerung des Reinheitsgrades der POR und der jeweiligen Steigerungsrate der spezifischen Aktivität (Abb. 26) machen deutlich, daß während der Aufreinigung kein Aktivitätsverlust eintritt. Dies konnte ohne Zusatz von exogenem Pchlid *a* erreicht werden. Zudem traten während der Aufreinigung nur geringe Verluste an endogenem Pchlid *a* (Abb. 20) auf. Daher war es erstmals möglich eine genaue Kalkulation aufzustellen, die zeigt, wieviele Moleküle Pchlid *a* in Etioplasten an die POR gebunden sind.

Nach dem ersten Zentrifugationsschritt (N1) finden sich 100 %, nach dem zweiten Zentrifugationsschritt (N2) knapp 90 % der in Etioplasten vorhandener POR wieder. Noch über 75 % ist nach dem letzten Zentrifugationsschritt (Ü3) vorhanden (Abb. 23). Die dazu korrespondierenden Werte für die Ausbeute an Pchlid *a* (Abb. 12) liegen bei ungefähr 86 % (N1), 80 % (N2) und 60 % (Ü3). Setzt man die in mehreren Versuchen bestimmten Werte für die Pchlid *a*-Gehalte in Relation zu den Gehalten an POR, zeigt sich, daß das molare Verhältnis in den genannten Fraktionen weitgehend nahe bei 1 bleibt (Abb. 24). In der Etioplastenfraktion ist ein Molekül Pchlid *a* an ein Molekül POR gebunden (Abb. 24) Dieses Ergebnis liegt im Widerspruch zu der Kalkulation von Apel *et al.* [1980], die von 2-3 mol Pchlid *a* / mol POR ausgeht. Ein Grund hierfür liegt in dem, für den Erhalt der Aktivität erforderlichen Zusatz von exogenem Pchlid *a*, der sich auf eine genaue Bestimmung des molaren Verhältnisses ungünstig auswirken muß.

Henningsen & Kahn [1971] solubilisierten mit Saponin aktive Komplexe aus Gerste mit einem Molekulargewicht von 63 kDa. Da fluoreszenzspektroskopisch nach partieller Photoumwandlung keine Energieübertragung zwischen Pchlid und Chlid meßbar war, vermuten die Autoren, daß in diesem aktiven Komplex nur ein Molekül Pchlid gebunden ist. Für eine vergleichbare Präparation aus der Bohne, die als Protochlorophyllid-Holochrom bezeichnet wird und ein Molekulargewicht von 170 kDa zeigt, kommen Henningsen *et al.* [1974] zu folgendem Ergebnis: „The lack of transfer of excitation energy, the high fluorescence polarization, and the lack of exciton interaction (K.W. Henningsen, A. Kahn and C. Houssier, unpublished data) with protochlorophyllide holochrome of 170.000 mol wt are consistent with the presence of a single protochlorophyllide per holochrome. But we cannot exclude the possibility that the 170.000 mol wt subunits contain two or three noninteracting chromophores.“

Die Ergebnisse von Ryberg & Sundquist [1982 a] stimmen mit den vorliegenden Daten weitgehend überein, sofern man den von ihnen eingesetzten Extinktionskoeffizienten von Pchlid *a* korrigiert. Ryberg und Sundquist benutzen für ihre Kalkulationen den von Houssier & Sauer [1969] veröffentlichten und von Porra [1991] kritisierten millimolaren Extinktionskoeffizienten von 22,0 (bei 626 nm in 80% Aceton). Porra hält einen, basierend auf der Photoumwandlung von Pchlid *a* zu Chlid *a* ermittelten Wert von 30,4 für richtig.

Nach der erfolgreichen schonenden Solubilisierung sollte die POR chromatographisch weiter bis zur Homogenität gereinigt werden. In der Vergangenheit wurden für die Reinigung solubilisierter nativer POR aus Pflanzenmaterial im wesentlichen drei Methoden angewendet.

Beer & Griffiths [1981] reinigten aus Triton-X-100 behandelten Membranen von Hafer die POR über Gelchromatographie an Sepharose 6B auf. Nicht photokonvertierbares Pchlid *a* wurde zusammen mit zwei Polypeptiden mit einem Molekulargewicht von 35 kDa, respektive 37 kDa eluiert. Nach Zugabe von NADPH und exogenem Pchlid *a* konnte die Aktivität wieder hergestellt werden. Die spezifische Aktivität konnte gegenüber den als Ausgangsmaterial und über Sucrose-Dichtegradienten gereinigten Etioplastenmembranen aber nicht gesteigert werden.

Richards *et al.* [1987] konnten aus mit CHAPS solubilisierter POR von Weizen-Etioplasten und nachfolgender Affinitätschromatographie zumindest größtenteils Fremdproteine abtrennen. Zn-Protopheide *a*, respektive Pchlid *a* wurden dabei kovalent an Sepharose 4B gebunden. Die Elution der POR erfolgte mit einem Überschuß an exogenem Pigment. Die Autoren stellen jedoch nur eine 2-fache Reinigung der POR gegenüber der POR in den Membranfraktionen fest. Die Aktivität konnte durch Zugabe von NADPH teilweise wiederhergestellt werden.

Ebenfalls nur unter Zusatz von NADPH und exogenem Pchlid *a* konnte Apel *et. al* [1980] über DEAE-Ionenaustauschchromatographie die POR aus Gersten-PLB's nach eigenen Angaben zur Homogenität reinigen. Deren PLB-Präparation, die in etwa der Fraktion N1 (Abb. 17) entspricht, enthält nur 13 Proteine. Es ist zu vermuten, daß aufgrund der offensichtlich geringen Proteinauftragsmengen für das SDS-Gel, auch in der Fraktion mit der chromatographisch gereinigten POR ein höherer Reinheitsgrad vorgespiegelt wird. Diese gereinigte POR wies eine durchschnittliche spezifische Aktivität von 0,85 nmol Chlid *a* / mg Protein pro Blitz auf. Der von den Autoren zusätzlich genannte Wert von 1,6 nmol Chlid *a* / mg Protein pro Blitz, war aus den Tabellenwerten zu diesen Versuchen nicht zu ersehen. Ferner wurden keine Angaben über die Ausbeute an POR gemacht. Ein entscheidender Nachteil ihrer Methode ist die Notwendigkeit, bereits bei der Solubilisierung der POR, exogenes Pchlid *a* zusetzen zu müssen. Dies erschwert einerseits die von den Autoren gemachte Kalkulation des molaren Verhältnisses von Pchlid *a* zur POR in Etioplasten, andererseits detaillierte Untersuchungen zur Substratspezifität unter Verwendung anderer exogener Pigmente. Apel *et al.* machen keine Angaben über die Anwesenheit von Carotinoiden in den gereinigten Fraktionen.

Die Autoren schließen aus ihren Experimenten, daß Pchlid *a* an die solubilierte POR gebunden sein muß, damit die enzymatische Aktivität nicht verloren geht. Dies kann bei dem in dieser Arbeit angewendeten Verfahren der chromatographischen Reinigung über einen DEAE-Ionenaustauscher nicht bestätigt werden. Im Gegensatz zu der Methode von Apel *et al.* werden bei der Isolierung der POR sowohl Pchlid *a* als auch Carotinoide abgetrennt. Dies wird erreicht, indem man vor dem Probenauftrag die Glycerin- und Detergengkonzentration in der Fraktion Ü3 um 2/3 herabsetzt. Die ternären Komplexe bleiben dabei noch erhalten. Der zuvor beschriebene stabilisierende Effekt hoher Glycerinkonzentrationen (30%) für solubilierte POR besteht bei der nachfolgenden Elution

dann nicht mehr. Der ternäre Komplex wird hierbei durch eine schnelle und drastische Erhöhung der Detergengkonzentration getrennt. Der Einfluß der Glycerinkonzentration auf den Erhalt ternärer Komplexe wird anhand der im Kapitel 3.3 diskutierten spektroskopischen Untersuchungen nochmals verdeutlicht werden.

Für den Erhalt der Aktivität in dem pigmentfreien Eluat mit der gereinigten POR mußte umgehend NADPH (nicht aber Pigment) zugesetzt und die Glycerinkonzentration wieder erhöht werden. Andernfalls ist ein rascher Verlust der Aktivität zu beobachten.

Der Erfolg der Reinigung der POR wird anhand der in den Abbildungen 15 und 17 gezeigten coomassie-, bzw. des silbergefärbten Gels in Abbildung 18 deutlich. Die densitometrische Auswertung zeigt, daß ca. 92 % des Proteins in der Fraktion EL die POR ist. Birve *et al.* [1996] konnten über Ionenaustauschchromatographie an S-Sepharose (Fast Flow) die mit einem Molekulargewicht von 38 kDa angegebene POR aus Weizen immerhin auch zu 84 % aufreinigen, dies jedoch nicht unter Abtrennung der Pigmente.

Bei der Antikörperfärbung gegen die POR reagiert, zusätzlich zur Hauptbande bei 36 kDa, eine Nebenbande (Abb. 16, B), deren Molekulargewicht bei Hafer um 2 kDa kleiner, bei Gerste um 2 kDa größer ist (Abb. 16, A). In Gerste entspricht sie damit der von Holtorf *et al.* [1995] mit 38 kDa beschriebenen PORB. Die Hauptbande bei 36 kDa ordnen die Autoren der PORA zu. Bei der Nebenbande (34 kDa) in Hafer könnte es sich um eine mit Gerste vergleichbare, nur kleinere PORB-Form handeln. Dabei ist es aber nicht auszuschließen, daß hier ein proteolytisches Abbauprodukt vorliegen kann. In diesem Zusammenhang ist jedoch zu erwähnen, daß auch Armstrong *et al.* [1995] eine isomere PORB-Form in *Arabidopsis thaliana* beschreiben, die mit 36 kDa ebenfalls kleiner ist als die PORA mit 37 kDa. Kürzlich konnten Oosawa *et al.* [2000] in *Arabidopsis thaliana* ein Gen für eine dritte isomere POR-Form (PORC - 44 kDa) identifizieren. Diese PORC wird jedoch nicht in etiolierten Pflanzen exprimiert.

Unter Berücksichtigung der jeweiligen Nebenbande liegt die POR im Eluat zur Homogenität aufgereinigt vor (Abb. 22, Fraktion EL_{kor.}). Die Tatsache, daß die POR erstmals völlig pigmentfrei gewonnen wird und dabei die spezifische Aktivität gegenüber der Fraktion Ü3 nochmals um etwas mehr als das doppelte und gegenüber der Etioplastenfraktion damit insgesamt um das fast 14-fache erhöht ist (Abb. 25 und 26), zeigt die Überlegenheit dieser Methode gegenüber den bisher bekannten Verfahren. Die Steigerung der spezifischen Aktivität korreliert während der gesamten Aufreinigung sehr gut mit dem jeweils bestimmten Reinheitsgrad der POR. Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß kein Aktivitätsverlust auftritt.

Am Ende der Aufreinigung liegt die Ausbeute an POR, in Bezug auf die in den Etioplasten vorhandene Menge, bei 32 %. Die Methode liefert somit aus 660 g Pflanzenmaterial (Frischgewicht) etwa 32 nmol zur Homogenität gereinigte, pigmentfreie und aktive POR.

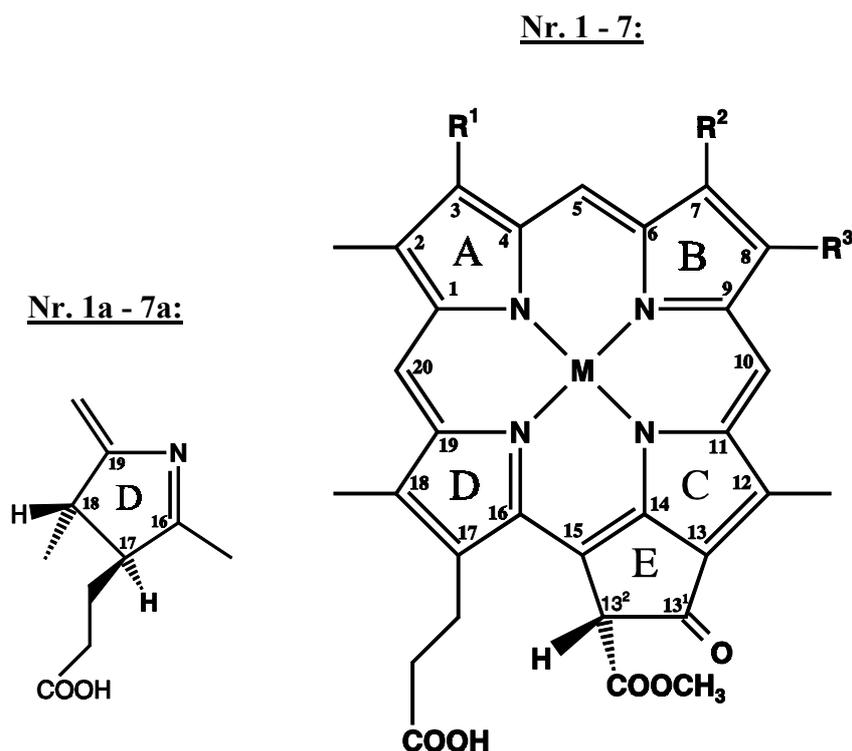
3.2 Untersuchungen zur Substratspezifität der POR

Die im vorangegangenen Kapitel beschriebene Pchlide α - und carotinoidfreie Aufreinigung der POR zur Homogenität bietet vorteilhafte Voraussetzungen für detaillierte, nachfolgend beschriebene, Untersuchungen zur Substratspezifität des Enzyms. Zugesetzte, strukturell unterschiedliche Pigmente können UV/Vis-spektroskopisch über den gesamten sichtbaren Bereich, einschließlich der Soretregion, erfaßt werden. Die HPLC-Analyse der Umsetzung einiger dieser Pigmente bei der Photoreduktion kann ohne einen bei der Detektion störenden Carotinoideinfluß erfolgen. Die Reinheit der verwendeten Enzympräparation in Verbindung mit der Abwesenheit von endogenem Pigment begünstigt kinetische Untersuchungen und erhöht deren Aussagekraft.

3.2.1 Charakterisierung der verwendeten Pigmente

3.2.1.1 Strukturformeln

Für die Untersuchungen zur Substratspezifität werden 13, zum natürlichen Substrat Pchlid *a* analoge Pigmentverbindungen, in Enzymtests mit der pigmentfrei aufgereinigten POR eingesetzt. Diese Verbindungen variieren dabei in den Seitenketten des Hauptringes und enthalten zum Teil Zink anstelle des Magnesiums als Zentralatom. Die strukturellen Unterschiede gehen aus den folgenden beiden Abbildungen 27 und 28 hervor. Die Nummerierung der Pigmente wird im gesamten Kapitel 3.2 fortlaufend beibehalten.

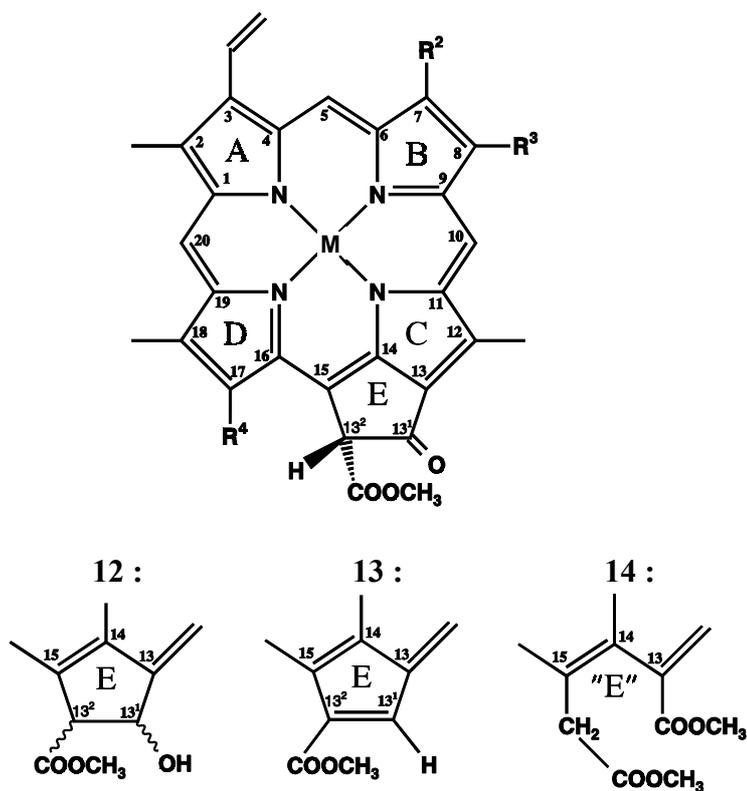


Nummer	Pigment	M	R ¹	R ²	R ³
1	Pchlid <i>a</i>	Mg	Vinyl	Methyl	Ethyl
2	[8-Vinyl]-Pchlid <i>a</i>	Mg	Vinyl	Methyl	Vinyl
3	Pchlid <i>b</i>	Mg	Vinyl	Formyl	Ethyl
4	Zn-Protopheide <i>a</i>	Zn	Vinyl	Methyl	Ethyl
5	Zn-[3-acetyl]-Protopheide <i>a</i>	Zn	Acetyl	Methyl	Ethyl
6	Zn-[3-formyl]-Protopheide <i>a</i>	Zn	Formyl	Methyl	Ethyl
7	Zn-7 ¹ -OH-Protopheide <i>a</i>	Zn	Vinyl	Hydroxymethyl	Ethyl

Abb. 27: Strukturelle Unterschiede der Pigmente Nr. 1(a) bis Nr. 7(a)

Die Grundstruktur von Pchlid *a* und die dazu unterschiedlichen Variationen bei 6 weiteren Pigmenten, die zum Teil Veränderungen am Zentralatom und/oder ausschließlich an den Seitenketten des Ringes A oder B beinhalten. Die Veränderung am Ring D (Nr. 1a - 7a) bezieht sich auf die nach der enzymatischen Reaktion mit der POR gebildeten Produkte.

8 - 14:



Nr.	Pigment	M	R ²	R ³	R ⁴
8	Chl <i>c</i> ₁	Mg	Methyl	Ethyl	Acrylsäure
9	Chl <i>c</i> ₂	Mg	Methyl	Vinyl	Acrylsäure
10	Chl <i>c</i> ₃	Mg	Carboxy- methyl	Vinyl	Acrylsäure
11	Zn-Protopheide <i>a</i> -methylester	Zn	Methyl	Ethyl	Propionsäure- Methylester
12	Zn-[13 ¹ -OH]-Protopheide <i>a</i>	Zn	Methyl	Ethyl	Propionsäure
13	Zn-13 ¹ -desoxo-13 ¹ , 13 ² -didehydro- Protopheide <i>a</i>	Zn	Methyl	Ethyl	Propionsäure
14	Zn-[3-vinyl]-rhodoporphyrin-15- essigsäure-13,15-dimethylester	Zn	Methyl	Ethyl	Propionsäure

Abb. 28: Strukturelle Unterschiede der Pigmente Nr. 8 bis Nr. 14

Die strukturellen Eigenschaften von 7 Pigmenten, die gegenüber Pchl *a* zum Teil am Zentralatom und/oder ausschließlich an den Seitenketten der Ringe B, E oder D verändert sind.

3.2.1.2 Extinktionskoeffizienten der Pigmente Nr. 1(a) bis 7(a) in Lösungsmittel und wässrigem Milieu.

Insbesondere für eine Auswertung von kinetischen Daten aus enzymatischen Tests mit den Pigmenten Nr. 1 bis Nr. 7 ist die Kenntnis ihrer Extinktionskoeffizienten sowie derer Produkte (Nr. 1 a bis Nr. 7 a) für das Puffersystem des Testansatzes erforderlich. Ein Vergleich der Absorptionswerte gleicher Pigmentkonzentrationen in Lösungsmittel mit den Werten in Reaktionspuffer (2.6.3.) führt zu durchwegs niedrigeren millimolaren Extinktionskoeffizienten für Produkte und Edukte in dem Puffersystem. Die Tabelle 1 zeigt die aus der Literatur bekannten, bzw. zum Teil abgeschätzten Extinktionskoeffizienten der Pigmente in Lösungsmittel, sowie die für die Berechnung der Extinktionskoeffizienten in Puffer benötigten und ermittelten Faktoren.

Tab. 1: Vergleich der Pigmentabsorptionen in Lösungsmittel und Reaktionspuffer (mit 0,3% DMSO)

Die Werte für den Faktor $A_{\text{Puffer}}/A_{\text{Lösungsmittel}}$ sind Mittelwerte mit \pm Standardabweichung aus 3 bis 4 voneinander unabhängigen Bestimmungen. Die angegebenen millimolaren Extinktionskoeffizienten beziehen sich auf 80 % Aceton als Lösungsmittel. Hiervon ausgenommen sind die Koeffizienten für die Pigmente Nr. 2, 3 und 5a (Werte gelten für 100 % Aceton), sowie für die Nr. 6a (Wert gilt für Diethylether). Die Werte in runden Klammern geben Schätzungen (siehe Text) wieder. Die übrigen Werte werden Literaturangaben (eingekreiste Zahlen) entnommen.

Literaturangaben: ① Brouers & Michel-Wolwertz [1983], ② Helfrich *et al.* [1999], ③ Schoch *et al.* [1995], ④ Porra [1991], ⑤ Jones *et al.* [1977], ⑥ Smith & Calvin [1966], ⑦ Holt & Morley [1959].

Nr.	Pigment	Werte für 80% Aceton			Werte für Reaktionspuffer	
		λ_{max} (nm)	ϵ_{mM} ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	Lit.	λ_{max} (nm)	Faktor $A_{\text{Puffer}}/A_{\text{Lsgm.}}$
1	Pchlidide <i>a</i>	627	30.4	①	634	0.788 ± 0.026
2	[8-Vinyl]-Pchlidide <i>a</i>	625	28.0	②	635	0.707 ± 0.022
3	Pchlidide <i>b</i>	580	18.5	③	594	0.603 ± 0.007
4	Zn-Protopheide <i>a</i>	624	(30.0)		627	0.623 ± 0.020
5	Zn-[3-acetyl]-Protopheide <i>a</i>	633	(30.0)		642	0.576 ± 0.027
6	Zn-[3-formyl]-Protopheide <i>a</i>	641	(30.0)		650	0.483 ± 0.018
7	Zn-7 ¹ -OH-Protopheide <i>a</i>	622	(25.8)		626	0.588 ± 0.018
1a	Chlide <i>a</i>	664	81.0	④	669	0.767 ± 0.015
3a	Chlide <i>b</i>	648	47.6	④	657	0.687 ± 0.014
4a	Zn-Pheide <i>a</i>	660	77.3	⑤	663	0.787 ± 0.030
5a	Zn-[3-acetyl]-Pheide <i>a</i>	672	65.2	⑥	680	0.856 ± 0.039
6a	Zn-[3-formyl]-Pheide <i>a</i>	683	80.0	⑦	695	0.729 ± 0.009
7a	Zn-7 ¹ -OH-Pheide <i>a</i>	655	(65.7)		663	0.814 ± 0.024

Alle Absorptionsmaxima sind in Puffer, verglichen mit den Maxima in Lösungsmittel, um 4 nm bis 14 nm bathochrom verschoben. Die Menge von 0,3 % DMSO verändert bei Zn-Komplexen in keiner Weise die Lage der Maxima oder die Verhältnisse der Absorptionswerte zwischen der Soretbande und der Q_X-Bande, bzw. der Q_Y-Bande. Bei Pchlidide *b* (3) verschieben sich die Maxima jedoch deutlich zu längeren Wellenlängen. Ebenso sinkt die Extinktion in der Soretbande, während die Extinktionen im roten Bereich unverändert bleiben.

Für alle Zn-Protopheide sowie für die Chlorine Nr. 5a, 6a und 7a beruhen die angegebenen Koeffizienten auf Schätzungen. Aufgrund der großen Ähnlichkeiten in der Struktur und den Absorptionsspektren zu Pchlide *a* wird der Koeffizient für die Pigmente 4, 5 und 6 mit einem ϵ_{mM} von 30,0 angenommen. Zn-7¹-OH-Pheide *a* (7a) zeigt noch ein gewohntes *a*-Typ Absorptionsspektrum auch wenn die Extinktion in der roten Bande verglichen mit Zn-Pheide *a* um 15 % niedriger liegt (bei Normalisierung der Soretbanden). Dieser Faktor ist in die Kalkulation der ϵ_{mM} Werte für die Pigmente Nr. 7 und 7a eingerechnet. Die Werte für die Pigmente Nr. 5a und 6a sind den bekannten Koeffizienten der entsprechenden Chlorophyll-Derivate gleichgesetzt.

3.2.1.3 Relative Fluoreszenzquantenausbeute ausgewählter Pigmente im Vergleich zu Pchlide *a*.

Die Pigmente Nr. 2 bis Nr. 4 und Nr. 6 bis Nr. 7 (Abb. 27) sowie Zn-Protopheide *b* werden auf Unterschiede bezüglich ihrer Fluoreszenz im Vergleich zu Pchlide *a* untersucht. Die Fluoreszenz-Emissionsspektren zeigen bei jeweils gleichen eingesetzten Pigmentmengen deutliche Unterschiede zwischen Pchlide *a* und den anderen untersuchten Pigmenten. Aus qualitativer Sicht fällt auf, daß Pchlide *b* (ebenso Zn-Protopheide *b*) im Gegensatz zu den *a*-Typ Pigmenten, im Emissionsspektrum ein deutlich erhöhtes längerwelliges Nebenmaxima bei 690 nm (687 nm für die analoge Zn-Verbindung) zeigt (Abb. 29).

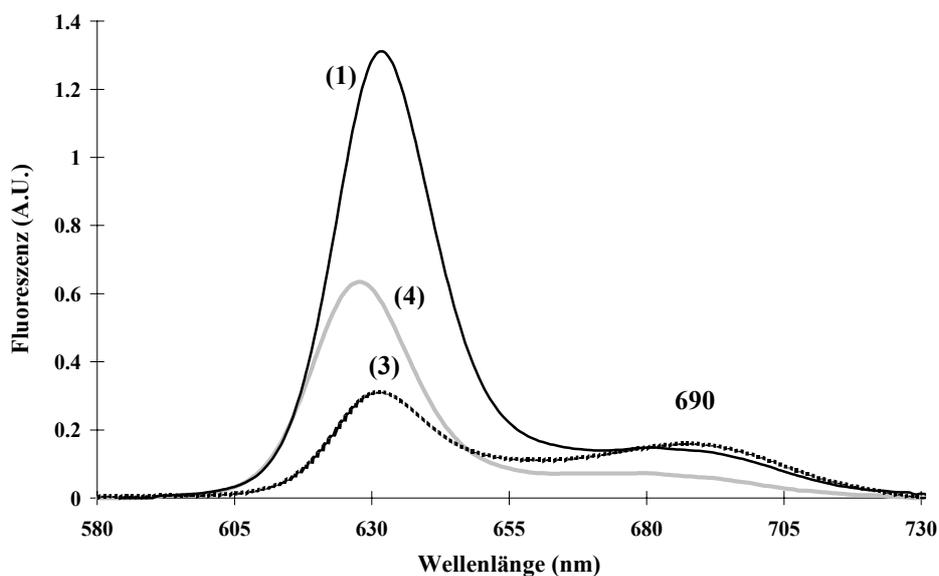


Abb. 29: Fluoreszenz Emissionsspektren

Die Emissionsspektren von Pchlide *a* (1), Pchlide *b* (3) und Zn-Protopheide *a* (4) bei gleicher Pigmentkonzentration (1,5 mM) in 2 ml 80 % Aceton.

Pchlide *a* zeigt eine deutlich höhere Fluoreszenz als die anderen Pigmente (Tab. 2). Die relative Quantenausbeute bei [8-Vinyl]-Pchlide *a* zeigt in diesem Vergleich gegenüber Pchlide *a* die geringste, die von Zn-Protopheide *b* die größte Abschwächung. Die zu Pchlide *a* strukturell analoge Zn-Verbindung weist eine Reduzierung um ca. 50 % auf (gleiches gilt für Zn-Protopheide *b* gegenüber Pchlide *b*).

Tab. 2: Fluoreszenzquantenausbeute relativ zu Pchlide *a*

Die angegebenen Werte für die relativen Ausbeuten resultieren aus ein bis zwei (Mittelwerte \pm Standardabweichung) Bestimmungen in 80 % Aceton. Die Emissionsbanden der Pigmente (jeweils 0,75, 1,5 und 3 mM) werden zwischen 580 nm und 750 nm integriert und die berechneten Flächen zu der für Pchlide *a* bestimmten Fläche in Relation gesetzt.

Nr.	Pigment	Excitationswellenlänge (nm)	Emissionsmaxima (nm)	Ausbeute (%)
1	Pchlide <i>a</i>	433	632 / 685	100
2	[8-Vinyl]-Pchlide <i>a</i>	438	632 / 684	84,2
3	Pchlide <i>b</i>	448	631 / 690	25,0 \pm 0,2
4	Zn-Protopheide <i>a</i>	434	627 / 682	47,4 \pm 2,6
6	Zn-[3-formyl]-Protopheide <i>a</i>	437	647 / --	55,4
7	Zn-7 ¹ -OH-Protopheide <i>a</i>	435	627 / 678	55,9
o.N.	Zn-Protopheide <i>b</i>	449	628 / 687	14,7 \pm 1,1

3.2.2 Enzymtestbedingungen zur Substratspezifität und zur Kinetik der Photoreduktion

3.2.2.1 Cofaktoren

NADPH

Wie in der Literatur beschrieben, benötigt die POR für die Katalyse NADPH als Cosubstrat. Enzymatische Tests mit der Fraktion Ü3 (3.3.2.3.) zeigen, daß bei längerer Lagerung (> 8 bis 10 Tage, 8 °C) dieser Präparationen in Reaktionspuffer (2.3.2.) ohne NADPH die Aktivität verloren geht. Durch Zugabe von 1 mM NADPH nach dieser Lagerperiode wird die Aktivität jedoch wieder hergestellt. Ein Zusatz von 1 mM NADH, 1 mM NAD⁺ oder 1 mM NADP⁺ kann dies nicht bewirken.

ATP

Vergleichende kinetische Untersuchungen der Photoreduktion, durchgeführt mit der pigmentfrei aufgereinigter POR und Zusatz von Pchlide *a* bzw. Zn-Protopheide *a* zeigen, daß weder hinsichtlich der Reaktionsgeschwindigkeit noch anderer Parameter, Unterschiede zwischen Proben mit oder ohne Zusatz von 1 mM ATP bestehen. Vor Zugabe von ATP aus einer wäßrigen Stammlösung muß diese zunächst auf einen pH-Wert im neutralen Bereich, bzw. auf pH = 7,2 eingestellt werden, da ansonsten die Aktivität der POR verloren geht.

3.2.2.2 Lichtsättigung

Die Intensität der Belichtung nimmt direkten Einfluß auf die bei der Photoreduktion gebildete Menge an Produkt und somit auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Die Abbildung 30 zeigt, daß im Bereich von 7,5 bis 15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion von der Lichtintensität abhängt. Bei 30, 60 und 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sind während der ersten 30 s Belichtung nur sehr geringfügige Unterschiede wahrzunehmen. Durch die Abnahme an gebildetem Produkt bei längerer Belichtungszeit (90 s bis 200 s) und Lichtintensitäten von

60 und 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, gegenüber einer Intensität von 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wird deutlich, daß in diesen Fällen von einer vermehrten Bleichung des gebildeten Produktes ausgegangen werden muß. Die Lichtsättigung, respektive die optimale Belichtungsintensität für die enzymatischen Tests zur Substratspezifität (3.2.3), zur Kinetik der Photoreduktion (3.2.4) und zur Hemmung der Photoreduktion durch nicht reduzierbare Pigmente (3.2.5), kann daher mit 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angegeben werden.

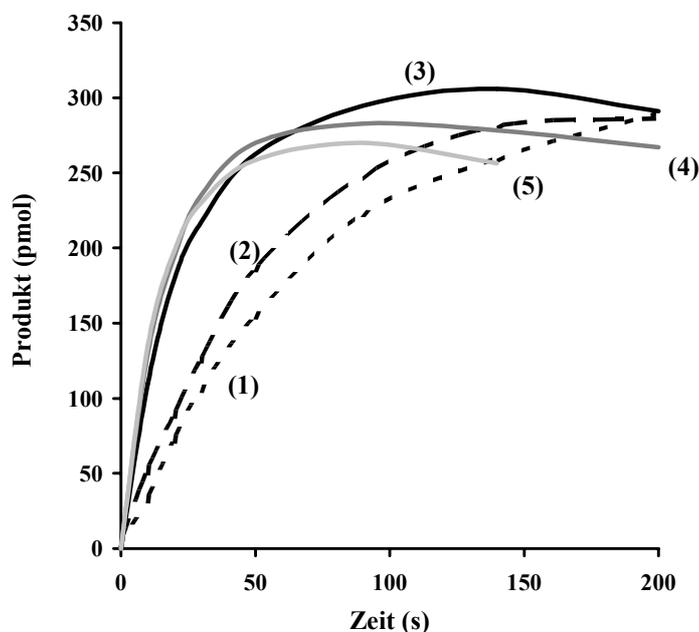


Abb. 30: Kinetischer Verlauf der Photoreduktion bei unterschiedlichen Lichtintensitäten

Gezeigt sind die aus Pchlide *a* (0,9 nmol) gebildeten Produktmengen (Chlide *a*) während 200 s Belichtung mit 7,5 (1), 15 (2), 30 (3), 60 (4) und 90 (5) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ unter ansonsten gleichen Testbedingungen. Die Tests erfolgen mit der Fraktion EL (19 μg Protein) in 0,75 ml Reaktionspuffer (2.3.2).

3.2.2.3 Substratoptimum

Enzymatische Tests mit verschiedenen Konzentrationen an Edukt bei gleichem POR-Gehalt zeigen eine Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Menge des angebotenen Substrats. Die höchste Reaktionsgeschwindigkeit wird erreicht, wenn das molare Verhältnis von Pigment zu Enzym dem Faktor 1 entspricht (Substratoptimum). Eine deutliche Hemmung der Reaktion tritt aber ein, wenn dieses Verhältnis den Faktor 2 übersteigt. In Abbildung 31 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen anhand zweier unterschiedlicher Pigmente, Pchlide *a* und Pchlide *b* dargestellt. Die Reaktionsgeschwindigkeit von Pchlide *b*, im Vergleich zu Pchlide *a*, ist unterhalb des Substratoptimums etwas herabgesetzt jedoch oberhalb dieses Optimums etwas vergrößert. Die Hemmung der Reaktion scheint also durch Substratüberschuß von Pchlide *a* etwas stärker ausgeprägt zu sein, als bei einem Überschuß an Pchlide *b*.

Die Versuche zur Kinetik der Photoreduktion (3.2.4) werden mit Pigmentkonzentrationen durchgeführt, die im Substratoptimum liegen. Bei der Bestimmung von Michaelis-Menten-Konstanten (3.2.4 und 3.2.5) werden Konzentrationen gewählt, die unterhalb dieses Optimums liegen.

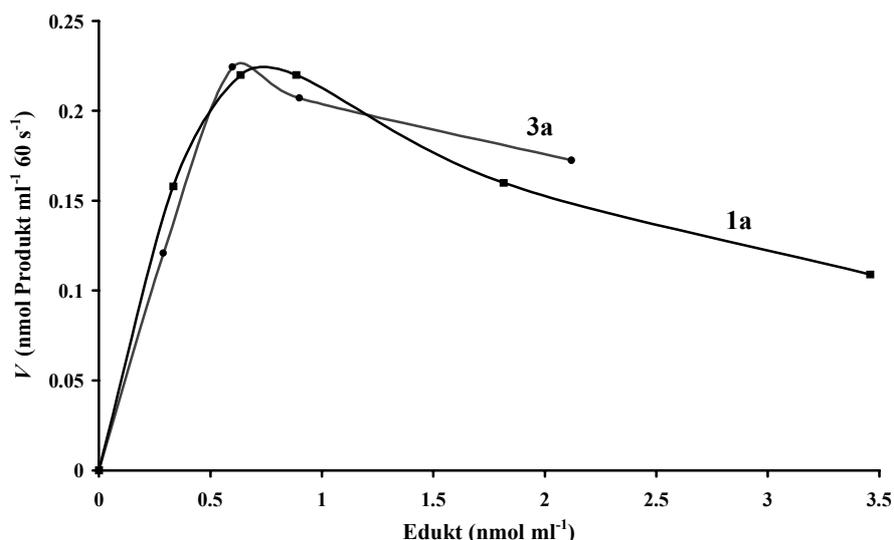


Abb. 31: Bestimmung des Substratoptimums für die Photoreduktion.

Die gebildete Menge an Chlide *a* (1a) und Chlide *b* (3a) nach 60 s Belichtung bei $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ist gegen die eingesetzten Substratmengen (angegeben als $13^2(R)$ -Konformer) aufgetragen. Die Konzentration an POR in den Testansätzen liegt gleichbleibend bei $0,75 \text{ nmol ml}^{-1}$.

3.2.3 Enzymatische Tests zur Substratspezifität

Der Ablauf der Photoreduktion und die Identifikation der gebildeten Produkte wird UV/Vis-spektroskopisch und anhand von HPLC-Analysen untersucht.

3.2.3.1 UV/Vis-Spektroskopie

Die in den Abbildungen 32 bis 33 dargestellten Enzymtests zeigen, daß alle Pigmente der Abbildung 27 von der POR als Substrat akzeptiert werden und photoreduzierbar sind. Die in Abbildung 28 aufgeführten Pigmente sind nicht photoreduzierbar.

Nach der Zugabe von Pigment zu der enzymatisch aktiven POR in Reaktionspuffer (2.3.2) erfolgt in Dunkelheit keine Reaktion. Die Reduktion wird erst durch Weißlicht gestartet. Die Belichtung in kurz aufeinanderfolgenden Intervallen mit unterschiedlicher Belichtungsdauer ermöglicht es, den Verlauf der Photoumwandlung (Hydrierung des Ringes D im Edukt) anhand der Änderung des Absorptionsspektrums genau zu verfolgen. Die Abbildung 32 stellt dies am Beispiel der Photoreduktion von Pchlide *b* (Abb. 32, A und B), respektive an Zn-[3-formyl]-Protopheide *a* (Abb. 32, C und D) dar. Deutlich werden isosbestische Punkte erkennbar, die zeigen, daß es sich bei der Reduktion um eine einheitliche Reaktion mit einer 1:1 Stöchiometrie ohne Nebenreaktionen handelt. Die in A und C gezeigten Spektren des Produktes werden nach Abzug des bei der Reduktion verbleibenden Eduktes dargestellt.

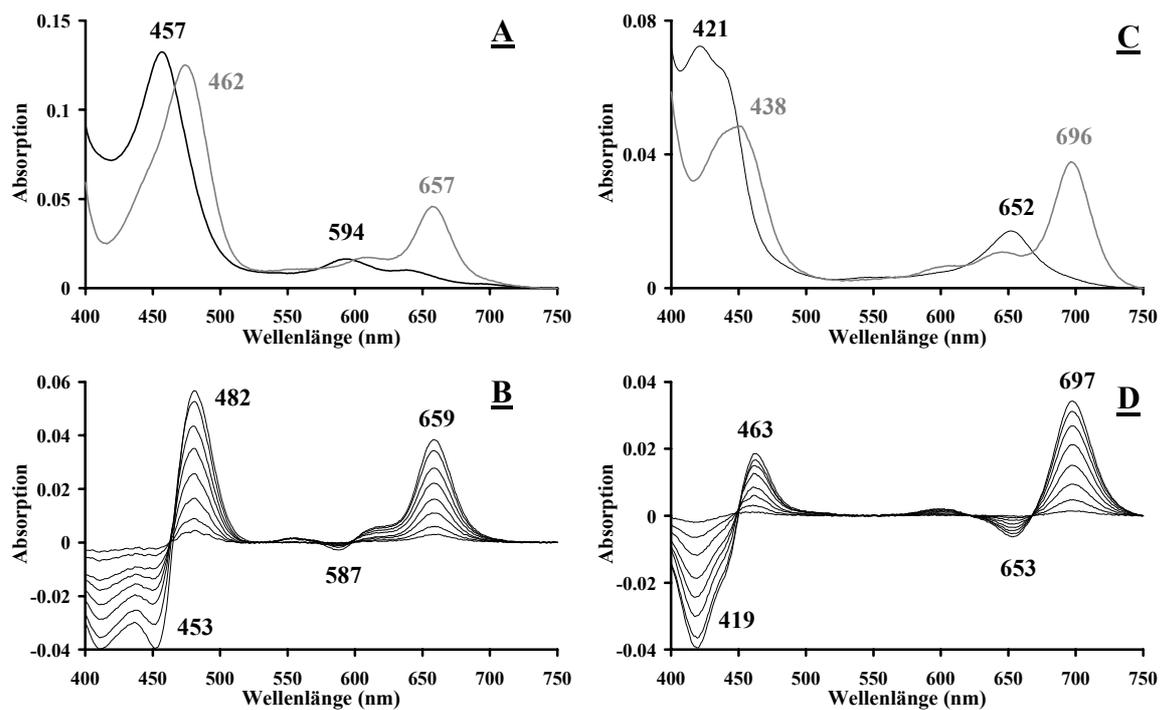


Abb. 32 : Verlauf der Photoumwandlung von (3) Pchl *a* (A, B) und (6) Zn-[3-formyl]-Protochlorophyllide *a* (C, D)

Die Tests verlaufen unter sättigenden Bedingungen hinsichtlich der Belichtungsintensität (3.2.2.2) und optimalen Substratkonzentrationen (3.2.2.3). Die Absorptionsspektren der Edukte (schwarz) und Produkte (grau) sind in A und C dargestellt. Der kinetische Verlauf der Reaktion ist mittels Differenzspektren der Spektren der belichteten Probe zu dem Spektrum der unbelichteten Probe gezeigt. Die Belichtungszeiten für Pchl *a* betragen 10, 20, 40, 60, 100, 130, 180 und 290 s. Für Zn-[3-formyl]-Protochlorophyllide *a* betragen diese 10, 40, 90, 170, 280, 400, 520 und 640 s.

Die Abbildung 33 zeigt die Photoreduktion von fünf weiteren Pigmenten (die Produktspektren enthalten hier, im Gegensatz zur Abb. 32, noch den bei der Reaktion verbliebenen Rest an Edukt). Die Edukte und Produkte zeigen, wie auch schon in Abbildung 32, eine zum Teil sehr unterschiedliche Lage der Absorptionsmaxima. Um sicherzustellen daß alle Edukte mit gleicher Intensität angeregt werden erfolgt die Belichtung daher generell mit Weißlicht.

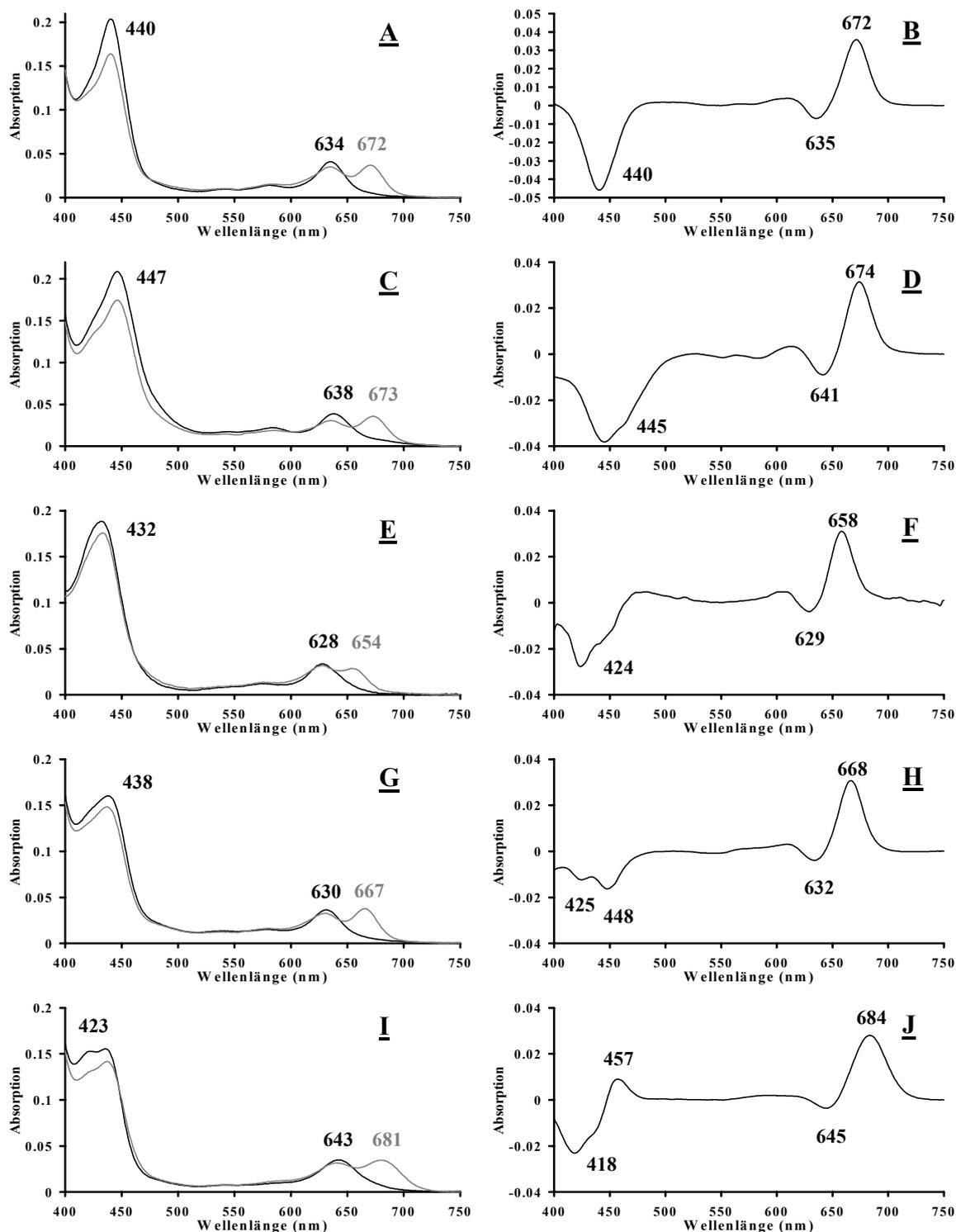


Abb. 33: Photoumwandlungen verschiedener Substrate der POR

In parallel geführten Enzymtests mit jeweils gleichen Eduktkonzentrationen (1,2 nmol / 0,75 ml⁻¹ Reaktionspuffer) ist die Bildung vergleichbarer Produktmengen (0,75 nmol) nach unterschiedlichen Belichtungszeiten dargestellt (Die Spektren geben dabei nicht den gesamten kinetischen Verlauf wieder).

A: (1) Pchlid *a* (schwarz), (1a) Chlid *a* (grau) nach 90 s Belichtung ; B: Differenzspektrum.

C: (2) [8-Vinyl]-Pchlid *a* (schwarz), (2a) [8-Vinyl]-Chlid *a* (grau) nach 210 s Belichtung ;

D: Differenzspektrum. E: (7) Zn-7¹-OH-Protopheid *a* (schwarz), (7a) Zn-7¹-OH-Pheid *a* (grau) nach 690 s Belichtung ; F: Differenzspektrum.

G: (4) Zn-Protopheid *a* (schwarz), (4a) Zn-Pheid *a* (grau) nach 170 s Belichtung ; H: Differenzspektrum.

I: (5) Zn-[3-acetyl]-Protopheid *a* (schwarz), (5a) Zn-[3-acetyl]-Pheid *a* 3 (grau) nach 175 s Belichtung ;

J: Differenzspektrum.

Auffällig sind die, trotz gleicher Eduktkonzentrationen ($1,2 \text{ nmol} / 0,75 \text{ ml}^{-1}$ Reaktionspuffer) in den parallel geführten Enzymtests, benötigten unterschiedlichen Belichtungszeiten um vergleichbare Mengen an Produkt zu erhalten. Die getesteten Substrate der POR zeigen demnach eine unterschiedliche Geschwindigkeit bei der Photoreduktion. Die Ergebnisse genauer kinetischer Untersuchungen hierzu werden in Punkt 3.2.4 vorgestellt.

3.2.3.2 HPLC-Untersuchungen

Die HPLC-Analyse der direkt nach Ablauf der Photoreduktion extrahierten Pigmente bietet neben den Absorptionsspektren (3.2.3.1) eine weitere Möglichkeit zur Identifikation der gebildeten Produkte. Alle Pigmente (mit Ausnahme von [8-Vinyl]-Chlide *a*) aus den Enzymtests werden durch Co-Chromatographie mit den authentischen Pigmenten anhand der Retentionszeiten identifiziert. Da für [8-Vinyl]-Chlide *a* kein Standard zur Verfügung steht, erfolgt die Identifizierung durch Vergleich der Absorptionsmaxima mit veröffentlichten Werten [Shioi & Beale 1987].

Die HPLC-Chromatogramme in Abbildung 34 bestätigen zusätzlich die bereits bekannte Stereospezifität des Enzyms [Helfrich *et al.* 1996]. Obwohl in den Enzymtests die Edukte als Racemate der 13^2 -Enantiomere angeboten werden, sind in den Chromatogrammen nur die $13^2(R)$ diastereomeren Produkte zu finden. Kleine Mengen an $13^2(S)$ -Formen entstehen bei der Probenaufbereitung durch chemische Epimerisierung und sind in der Abbildung 34 A für Chlide *a* an der etwas längeren Retentionszeit zu erkennen.

In Retentionszeiten zwischen 40 min und 50 min sind nur minimale Spuren von Carotinoiden zu erkennen. Größere Mengen würden die Edukte verdecken. Die Detektionswellenlänge von 435 nm ermöglicht die Detektion von Produkten und Edukten, da beide hier einen hohen Extinktionskoeffizient aufweisen.

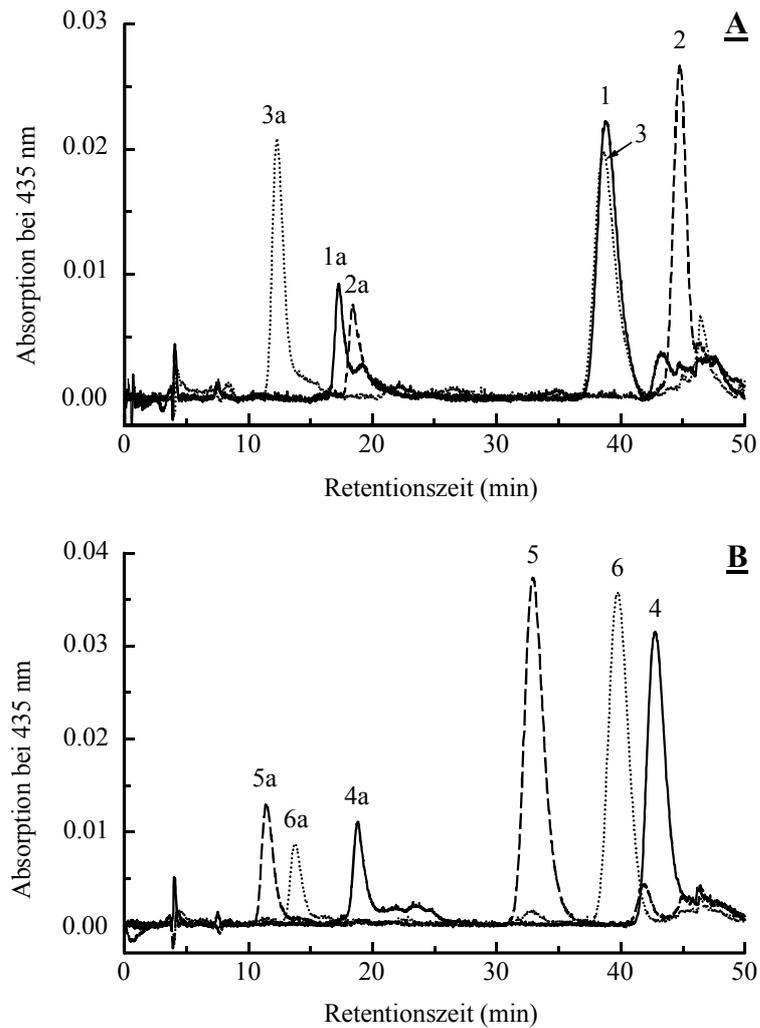


Abb. 34: HPLC-Trennung der aus Enzymtests extrahierten Pigmente.

Die Kombination einer ODS-Säule mit einer nachgeschalteten Polyethylen-Säule zeigt die Trennung der Edukte 1-6 und der korrespondierenden Produkte (1a bis 6a):

A: Pchlide *a* (1), [8-Vinyl]-Pchlide *a* (2), Pchlide *b* (3)

B: Zn-Protopehde *a* (4), Zn-[3-acetyl]-Protopehde *a* (5) und Zn-[3-formyl]-Protopehde *a* (6).

3.2.4 Kinetik der Photoreduktion

Mit den als Substrat akzeptierten Pigmenten werden Reaktionskinetiken erstellt, die, wie in Punkt 3.2.3.1 bereits angedeutet, zeigen, daß die Geschwindigkeit der Reduktion bei jedem der getesteten Pigmente unterschiedlich ist. Bevor die Ergebnisse im Detail vorgestellt werden, soll zunächst auf einige Punkte hingewiesen werden, die bei der Testdurchführung und der Auswertung eine maßgebliche Rolle spielen und beachtet werden müssen:

Die Tests mit den unterschiedlichen Pigmenten erfolgen unter einheitlichen Bedingungen (2.8) hinsichtlich der eingesetzten Pigment- und POR-Konzentrationen, des verwendeten Puffers sowie der äußeren Bedingungen (Temperatur, Handhabung etc.).

Die Reaktion erfolgt einheitlich ohne Nebenreaktionen in einer 1:1 Stöchiometrie (3.2.3.1).

Ohne Belichtung erfolgt keine Photoreduktion. Die Belichtungsintervalle unterschiedlicher Dauer, die jeweils nur durch die Meßzeit (etwa 1 min) unterbrochen werden, entsprechen daher immer der Reaktionszeit. Das Meßlicht des Spektrophotometers löst keine Photoreduktion aus.

Um, wie bereits erwähnt, eine gleich intensive Anregung der unterschiedlich absorbierenden Pigmente zu gewährleisten, erfolgt die Anregung mit Weißlicht (3.2.3.1). Die für Pchlid *a* bestimmte optimale Belichtungsintensität liegt bei $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (3.2.2.2). Unter diesen Bedingungen ist die Reaktion diffusionskontrolliert. Eine Beschleunigung der Reaktion durch Erhöhung der Intensität auf $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tritt bei den Substratanalogen nicht auf.

Die molaren Extinktionskoeffizienten der Produkte und Edukte in Reaktionspuffer müssen für die Auswertung bekannt sein (siehe 3.2.1.3).

Alle eingesetzten Edukte der Reaktion sind Racemate. Da nur die $13^2(R)$ -Konformeren von der POR als Substrate akzeptiert werden, wird bei der Auswertung nur die Hälfte der eingesetzten Pigmentmengen berücksichtigt. Eine Epimerisierung ist aufgrund der geringen zeitlichen Dauer der Enzymtests zu vernachlässigen.

Die Berechnung der gebildeten Produktmengen erfolgt aus Differenzspektren zwischen dem Spektrum vor und den Spektren nach der Belichtung anhand der Extinktionsdifferenzen im roten Wellenlängenbereich der Produkte. In diesem Bereich findet sich kaum eine Überlappung mit der Absorption des Edukts. Eine Ausnahme hierzu zeigt sich bei Chlide *b* / Pchlid *b* (und deren Zn-Analogen). Von der bei λ_{657} nm gemessenen Absorption sind 13,75 % der Pchlid *b* Absorption zuzurechnen. Dies wird bei der Auswertung entsprechend berücksichtigt.

3.2.4.1 Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit

In der Abbildung 35 sind die belichtungszeitabhängig gebildeten Mengen an Produkt festgehalten. Der Anstieg erfolgt während der ersten 30 s weitgehend linear. Um leichte Abweichungen von der Linearität auszugleichen, werden für die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit Tangenten an die Graphen angelegt und aus deren Steigung die anfängliche maximale Reaktionsgeschwindigkeit ermittelt.

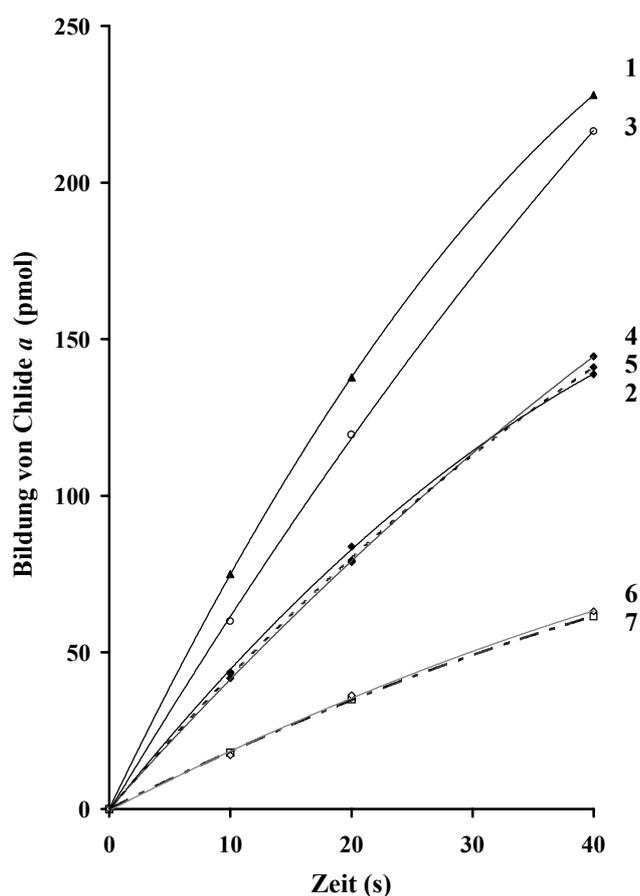


Abb. 35: Die bei der Photoreduktion in Abhängigkeit von der Belichtungszeit gebildete Produktmenge
Die Reaktionskinetiken werden unter optimalen Bedingungen für die Substratkonzentrationen (siehe 3.2.2.3) und die Lichtintensität (3.2.2.2) durchgeführt.

In absteigender Reihenfolge dargestellt ist die Photoreduktion von je 1,2 nmol Pchlide *a* (1), Pchlide *b* (3), Zn-Protopheide *a* (4, schwarz), Zn-[3-acetyl]-Protopheide *a* (5, gestrichelt), [8-Vinyl]-Pchlide *a* (2, grau), Zn-[3-formyl]-Protopheide *a* (6, grau) und Zn-7¹-OH-Protopheide *a* (7, gestrichelt) mit 0,75 nmol POR in 0,75 ml Reaktionspuffer.

Die Tabelle 3 faßt die Ergebnisse dieser Bestimmungen zusammen und bezieht die Reaktionsgeschwindigkeiten auf die eingesetzte Proteinmenge, bzw. setzt sie in Bezug zu mol POR. Drei Reaktionstypen treten dabei hervor. Die höchsten V_{\max} -Werte erzielen Pchlide *a* und Pchlide *b*. Im Vergleich zu diesen „schnellen“ Reaktionen, zeigen [8-Vinyl]-Pchlide *a*, Zn-Protopheide *a* und Zn-[3-acetyl]-Protopheide *a* nur eine „mittlere“ Reaktionsgeschwindigkeit. Deutlich verlangsamt ist die Reaktionsgeschwindigkeit von Zn-[3-formyl]-Protopheide *a* und Zn-7¹-OH-Protopheide *a*.

Tab. 3: Kinetik der Photoreduktion.

Die aus den Daten der Abbildung 35 ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten (siehe Text) werden auf die Gesamtproteinmenge und auf nmol POR bezogen.

Nr.	Pigment	V_{\max} (nmol Produkt · min ⁻¹ · mg ⁻¹)	V_{\max} (nmol Produkt · min ⁻¹ · nmol POR ⁻¹)
1	Pchlid <i>a</i>	20,9	0,84
2	[8-Vinyl]-Pchlid <i>a</i>	12,2	0,49
3	Pchlid <i>b</i>	17,9	0,72
4	Zn-Protopheide <i>a</i>	12,8	0,51
5	Zn-[3-acetyl]-Protopheide <i>a</i>	12,5	0,50
6	Zn-[3-formyl]-Protopheide <i>a</i>	5,4	0,22
7	Zn-7 ¹ -OH-Protopheide <i>a</i>	5,4	0,22

Ein Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten und den in der Tabelle 2 (3.2.1.3) beschriebenen gravierenden Unterschieden in den Fluoreszenzausbeuten ist nicht erkennbar. So ist beispielsweise die Fluoreszenzausbeute von Pchlid *b* gegenüber Pchlid *a* stark vermindert, die Reaktionsgeschwindigkeit jedoch nur geringfügig herabgesetzt.

3.2.4.2 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante für Pchlid *a* und Pchlid *b*

Für die beiden Pigmente, die bei der Photoreduktion die höchsten Reaktionsgeschwindigkeiten zeigen (Pchlid *a* und Pchlid *b*), wird die Michaelis-Menten-Konstante (K_M -Wert) bestimmt. So soll gezeigt werden, inwieweit sich die Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit in einer unterschiedlichen Affinität des Enzyms zu dem jeweiligen Substrat widerspiegeln. Die Tests verlaufen mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen, die alle unterhalb des Substratoptimums liegen, aber gleichen Enzymkonzentrationen (2.8.2.2.2). Die Abbildung 36 zeigt die zugrundeliegenden Daten für die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten. Die während der ersten 20 s bis 30 s der Belichtung gebildeten Produktmengen werden zur Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit herangezogen (die Auswertung erfolgt wie in 3.2.4.1 beschrieben).

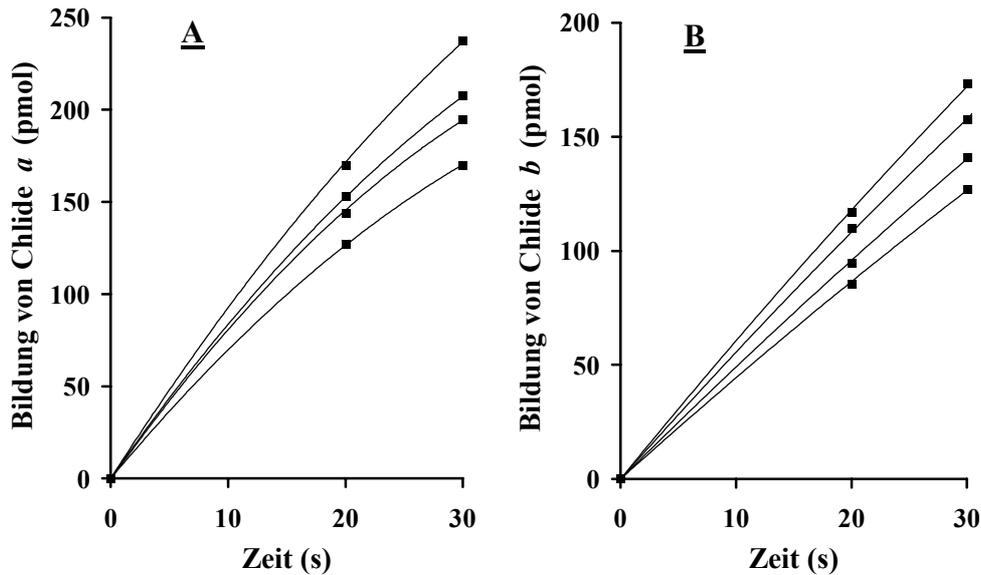


Abb. 36: Bildung von unterschiedlichen Produktmengen in Abhängigkeit von der Belichtungszeit unter Einsatz unterschiedlicher Substratmengen

A: Photoreduktion von Pchlide *a* (0,56, 0,70, 0,86 und 1,12 μM)

B: Photoreduktion von Pchlide *b* (0,62, 0,93, 1,03 und 1,29 μM)

Die aus den Daten der Abbildung 36 ermittelten Anfangsgeschwindigkeiten werden für die exakte Bestimmung des K_M -Wertes doppelt-reziprok gegen die jeweiligen Substratkonzentrationen aufgetragen (Abb. 37).

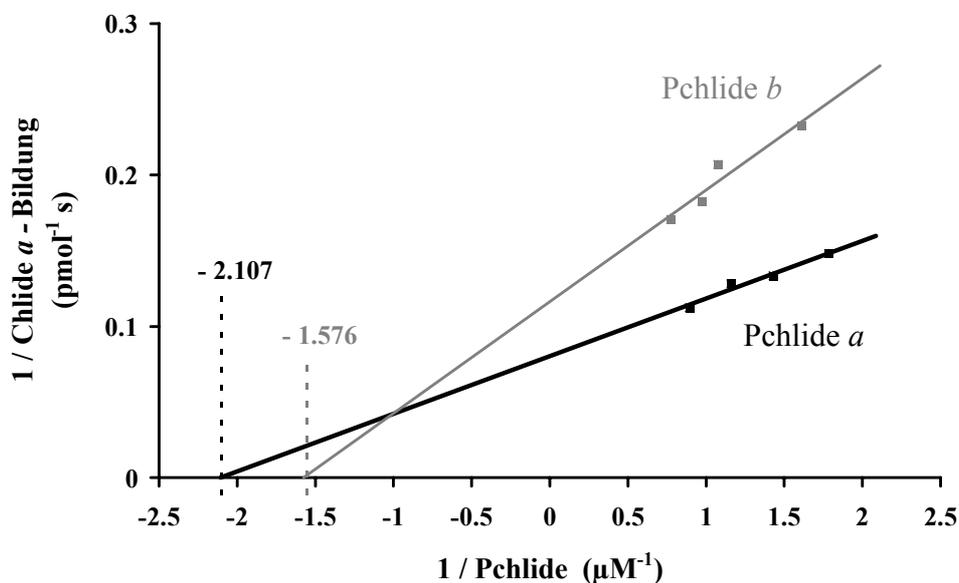


Abb. 37: Lineweaver-Burk-Diagramm der Umsetzung von Pchlide *a* und Pchlide *b* zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante.

Aus dem Schnittpunkt der Geraden durch die Meßergebnisse mit der x-Achse ergibt sich für Pchlide *a* ein K_M -Wert von 0,47 μM , für Pchlide *b* ein Wert von 0,63 μM . In diesen Konzentrationen sind die Hälfte der aktiven Zentren des Enzyms mit Substrat besetzt.

3.2.5 Hemmung der Photoreduktion durch nicht photoreduzierbare Pigmente

Die Pigmente der Abbildung 28 werden von der POR nicht reduziert. Inkubiert man bei Enzymtests (vergleichbar mit 3.2.4.1) die POR vor Zugabe des akzeptierten Substrates (hier Zn-Protopheide *a*), in gleichen Konzentrationen mit diesen nicht akzeptierten Pigmenten, wird die Geschwindigkeit der Photoreduktion in unterschiedlichem Ausmaß herabgesetzt (Tab. 4).

Tab. 4: Ausmaß der Herabsetzung der Reaktionsgeschwindigkeit von Zn-Protopheide *a* durch Vorinkubation mit nicht akzeptierten Pigmenten

Nr.	Pigment	relative Reduktion der Reaktionsgeschwindigkeit (%)
8	Chl <i>c</i> ₁	40
9	Chl <i>c</i> ₂	53
11	Zn-Protopheide <i>a</i> methylester	29
12	Zn-[13 ¹ -OH]-Protopheide <i>a</i>	43
13	Zn-13 ¹ -desoxo-13 ¹ ,13 ² - didehydro-Protopheide <i>a</i>	9
14	Zn-[3-vinyl]-rhodoporphyrin-15-essigsäure-13,15-dimethylester	32

Die stärkste Hemmwirkung geht von Chl *c*₂, bzw. Chl *c*₁ aus. Geht man davon aus, daß die Herabsetzung der Reaktionsgeschwindigkeit auf der Bindung dieser nicht reduzierbaren Pigmente an das aktive Zentrum des Enzyms beruht, muß sich der K_M -Wert für photoreduzierbare Substrate verkleinern ohne daß die maximale Reaktionsgeschwindigkeit beeinflusst wird. In mit den Enzymtests unter 3.2.4.2 methodisch vergleichbaren Bestimmungen wird der Einfluß einer Vorinkubation (2.8.2.2.3) mit Chl *c*₁ auf den K_M -Wert und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit von der Photoreduktion von Pchl *a* ermittelt. Die Abbildung 38 veranschaulicht die Ergebnisse dieser Bestimmung. Der K_M -Wert ist in dem Eadie-Hofstee-Diagramm durch die negative Steigung der Geraden durch die Meßergebnisse wiedergegeben. Die Steigung der Bestimmung in Gegenwart von Chl *c*₁ unterscheidet sich stark von der Steigung ohne Chl *c*₁.

Der K_M -Wert liegt nur noch bei 0,99 μ M. Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten, die am Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse abzulesen sind, unterscheiden sich jedoch kaum. Diese Resultate sprechen für eine kompetitive Hemmung der Photoreduktion durch Chl *c*₁.

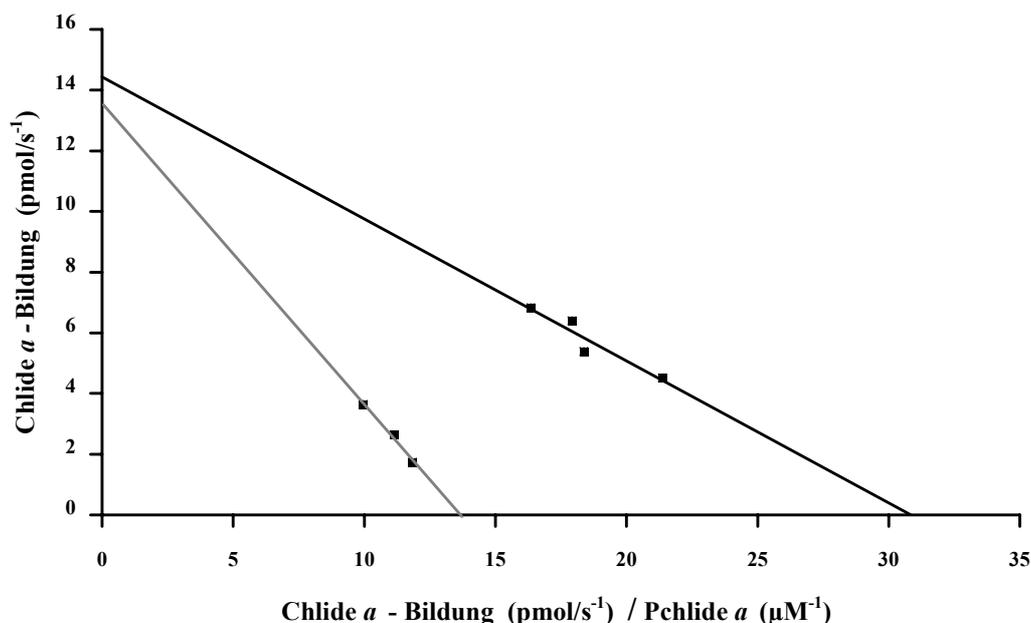


Abb. 38: Umsetzung von Pchl. a ohne, sowie in Gegenwart von Chl. c₁ zur Bestimmung des Hemmtyps

In dem Eadie-Hofstee-Diagramm ist die graue Linie durch die Meßergebnisse der Photoreduktion von Pchl. a (0,2 bis 0,55 µM) bei Vorinkubation mit Chl. c₁ (0,65 µM) gelegt.

Die Formel lautet $y = -0,9931x + 13,566$.

Die schwarze Linie ist durch die Meßergebnisse aus den Tests mit Pchl. a ohne die Gegenwart von Chl. c₁ gelegt. Die Formel lautet $y = -0,468x + 14,436$.

3.2.6 Diskussion

Das natürliche endogene Substrat der POR in etiolierten Angiospermen ist Pchl. a. In Weizen und Hafer wurde ausschließlich Pchl. a gefunden, während beispielsweise in Erbse ein Pchl. a-Pool mit 70 % Pchl. a und 30 % [8-Vinyl]-Pchl. a existiert [Whyte & Griffiths 1993]. Reinbothe C. *et al.* [1999] erwähnen, daß eigenen unpublizierten Ergebnissen zufolge, Pchl. b in unterschiedlichen Mengen in etiolierten Gerstenblättern vorhanden ist. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu zahlreichen spektroskopischen Untersuchungen an etiolierten Angiospermen [Adamson *et al.* 1997, Rebeiz *et al.* 1999] und insbesondere an Gerste [Scheumann *et al.* 1999], bei denen kein Pchl. b detektiert wurde.

Helfrich *et al.* [1996] konnten nachweisen, daß nur die 13²(R)-Konfiguration von Pchl. a von der POR als Substrat akzeptiert wird. Die 13²(S)-Konfiguration ist für die POR weder Substrat noch kompetitiver Hemmstoff. Ob natürliches, nicht photokonvertierbares Pchl. a [Virgin 1993, McEwen *et al.* 1994] diese Konfiguration zeigt, ist noch nicht bekannt.

Neben Pchl. a ist in etiolierten Angiospermen auch Pchl. zugegen. Griffiths [1980] findet in 9 Tage etiolierter Gerste ein Verhältnis Pchl. a zu Pchl. 3,9:1, kann aber an *in vitro* Versuchen mit Etioplasten aus Gerste zeigen, daß Pchl. kein Substrat für die POR ist. Dies wird von Schoch *et al.* [1995] bestätigt. Gleichzeitig sehen die Autoren Pchl. auch nicht als kompetitiven Hemmstoff an.

Mit Hilfe von strukturell zu dem natürlichen Substrat modifizierten Pigmenten wurde die Substratspezifität der POR *in vitro* unter anderem von Griffiths [1980], Schoch *et al.* [1995] und Helfrich *et al.* [1996] untersucht. In den dabei verwendeten Membransystemen (Etioplasten, respektive PLB's) mußte das photokonvertierbare endogene Pchl *a* zunächst durch Vorbelichtung von der Bindungsstelle der POR entfernt werden, bevor das zu testende Pigment zugesetzt werden konnte. Der Nachteil dieser Methode besteht insbesondere darin, daß in spektroskopischen Analysen durch die Vorbelichtung entstehendes Chl *a* zusammen mit den Carotinoiden das Reaktionsprodukt des exogenen Pigments verdeckt. Auf diese Weise können nur Differenzspektren im roten Wellenlängenbereich Aufschluß über den Reaktionsverlauf geben. Da nach der nun vorliegenden Methode zur Isolierung der POR endogene Pigmente nicht mehr zugegen sind, kann die Reaktion auch anhand absoluter Spektren über den gesamten sichtbaren Bereich, inklusive der Soretbande, verfolgt werden.

Dreizehn Substratanaloga zu Pchl *a* wurden für die Tests zur Substratspezifität eingesetzt. Sechs dieser Verbindungen sind gegenüber der Struktur des natürlichen Pigments nur an den Seitenketten des Ringes A oder des Ringes B verändert und zum Teil wurde Mg, als Zentralatom, durch Zn ersetzt (Abb. 27). Sämtliche strukturellen Veränderungen werden von der POR akzeptiert, das heißt die Pigmente sind photokonvertierbar. Die Reaktion ist anhand der spektralen Veränderungen über den sichtbaren Bereich von 400 nm bis 750 nm gut zu verfolgen (Abb. 32 und 33). In der Abbildung 32 wird dabei anhand der klaren isosbestischen Punkte im spektralen Verlauf der Reduktion deutlich, daß die Reaktion einheitlich in einer 1:1 Stöchiometrie ohne Nebenreaktionen abläuft. Die Identifizierung der neu gebildeten Produkte erfolgt größtenteils über ein HPLC-System, das es ermöglicht, Chlorine und die korrespondierenden Porphyrine in einem Lauf zu trennen (Abb. 34).

In weiteren Experimenten wurde untersucht, inwieweit die strukturellen Unterschiede innerhalb der photokonvertierbaren Pigmente Einfluß auf die Reaktionskinetik haben können. Für eine genaue Auswertung derartiger Kinetiken über UV/Vis-spektroskopische Daten ist die Kenntnis der Extinktionskoeffizienten der Edukte und Produkte der Reaktion von entscheidender Bedeutung. Die aus der Literatur bekannten Extinktionskoeffizienten der Pigmente in Lösungsmitteln wurden für die Ermittlung der Extinktionskoeffizienten in dem hier verwendeten Puffersystem herangezogen. Waren dabei für einzelne Pigmente keine Koeffizienten bekannt, wurden diese aufgrund struktureller Ähnlichkeiten und vergleichbarer Absorptionseigenschaften abgeschätzt (Tab. 01). In diesem Zusammenhang von besonderem Interesse war der Extinktionskoeffizient des natürlichen Substrates Pchl *a*. Dabei wurde der von Porra [1991] in 80 % Aceton bestimmte Wert von ϵ_{mM} 30,4 für die Ermittlung des Extinktionskoeffizienten in Puffer zugrunde gelegt. Er liegt etwas unterhalb des von Kahn [1983] bestimmten Wertes von ϵ_{mM} 31,1, der jedoch nach Ansicht von Porra auf einem falschen Wert für den Extinktionskoeffizienten von Chl *a*, veröffentlicht von Mackinney [1941], beruht.

Bedenkt man, daß für kristallines Chl *c*₁ in Aceton nach Jeffrey [1972] ein Wert von ϵ_{mM} 27,3 und für Chl *c*₂ in der gleichen Arbeit ein Wert von ϵ_{mM} 24,5 bestimmt wurde, so beträgt der Anstieg des ϵ_{mM} durch den Verlust einer Doppelbindung, bei ansonsten gleicher Struktur dieser Pigmente (Abb. 28), ca. 10%. Geht man davon aus, daß sich im Vergleich zu diesen Werten Chl *c*₁ mit seiner Acrylseitenkette und Pchl *a* mit der Propionseitenkette, formal ebenfalls nur durch eine fehlende Doppelbindung unterscheiden, so sollte der Anstieg des ϵ_{mM} von Pchl *a* gegenüber dem von Chl *c*₁ ebenso in etwa 10 % betragen. Auch aufgrund dieser Überlegung erscheint ein ϵ_{mM} zwischen 30 und 31 in 80 % Aceton für Pchl *a* wahrscheinlich.

Neben der Kenntnis der Extinktionskoeffizienten waren für die Durchführung der kinetischen Untersuchungen und für die Ergebnisinterpretation zwei weitere Punkte von Bedeutung.

Die unterschiedlich absorbierenden Pigmente mußten gleichmäßig angeregt werden. Daher wurde für die Belichtung Weißlicht verwendet. In den eingesetzten Pigmentkonzentrationen wurde eine für die Anfangsgeschwindigkeit der Photoumwandlung sättigende Belichtungsintensität gewählt. Bei Pchlide *a* lag diese bei einer Intensität von $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Höhere Intensitäten führten im weiteren Verlauf der Photoumwandlung bereits zu Ausbleicheffekten bei dem gebildeten Produkt (Abb. 30).

Der zweite zu beachtende Punkt ergibt sich bereits aus dem Ergebnis, daß *in vitro* und mit hoher Wahrscheinlichkeit auch *in vivo* nur ein Molekül Pchlide *a* an ein Molekül POR gebunden ist. Die Abbildung 31 zeigt für die Pigmente Pchlide *a* und Pchlide *b* eine deutliche Hemmung der Reaktionsgeschwindigkeit, wenn diese in einer Konzentration eingesetzt werden, die das 1:1 Verhältnis deutlich überschreitet. Bei der Durchführung der kinetischen Untersuchungen wurde das Verhältnis von Substrat zu Enzym daher bei 1:1 gehalten.

In vivo kann durch Infiltration der Pflanzen mit 5-Aminolaevulinsäure ein Überschuß an Pchlide *a* erzeugt werden [Granick 1961, Gassman & Bogorad 1967]. Bereits Gassman [1973] konnte hierbei eine deutliche Herabsetzung, der bei Belichtung gebildeten Chlide *a* Menge, feststellen. Die *in vitro* beobachtete Substrathemmung ist als Ursache für diesen Effekt durchaus vorstellbar.

Unter Berücksichtigung der genannten Punkte zeigten Pchlide *a* und die photokonvertierbaren Substratanaloge in den Untersuchungen unterschiedliche maximale Reaktionsgeschwindigkeiten. Dabei lassen sich die einzelnen Pigmente in drei Gruppen mit einer „schnellen“, einer „mittelschnellen“ und einer „langsamen“ Reaktionsgeschwindigkeit einteilen (Tabelle 3).

Ein Kinetikvergleich von Zn-Protopheide *a* (Pigment Nr. 4, Abb. 27) mit Pchlide *a* (Pigment Nr. 1, Abb. 27) verdeutlicht, daß der Austausch des Zentralatoms Mg mit Zn zu einer Verlangsamung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit führt. Griffiths [1980] zeigte bereits, daß dieser Austausch von der POR akzeptiert wird, während metallfreies Protopheophorbid ebenso wie Kupfer-, Cobalt- oder Nickelhaltiges Protopheophorbid nicht reduziert werden. Das Zentralatom spielt also bei der Bindung des Pigments an die POR offensichtlich eine wichtige Rolle. Die Situation bei der POR ist dabei wohl vergleichbar mit der Chlorophyll-Synthase, für die nach Helfrich & Rüdiger [1992] ein 5-fach koordinierter Metallkomplex vorgeschlagen wird, wobei 4 Bindungen von den Tetrapyrrol-Stickstoffen und eine Bindung von einem noch nicht bekannten 5. Ligand im aktiven Zentrum des Enzyms kommt.

Vergleicht man das Verhalten von Zn-[3-formyl]-Protopheide *a* (Pigment Nr. 6, Abb. 27) mit Zn-[3-acetyl]-Protopheide *a* (Pigment Nr. 5, Abb. 27) fällt auf, daß die kleinere Formyl-Gruppe am Ring A, die charakteristisch für das kürzlich beschriebene Chlorophyll *d* [Miyashita *et al.* 1997] ist, nicht zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit führt. Im Gegenteil, sie verlangsamt sich gegenüber dem Pigment mit der größeren Acetyl-Gruppe am Ring A, ein Substituent der für Bacteriochlorophyll *a* charakteristisch ist. Bei den unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten von Zn-7¹-OH-Protopheide *a* (Pigment Nr. 7, Abb. 27) und Pchlide *b* (Pigment Nr. 3, Abb. 27) zeigt sich ebenfalls, daß sterische Ursachen die Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit nicht erklären können. Beide Seitenketten am Ring B sind in etwa gleich groß.

Interessanterweise reagiert [8-Vinyl]-Pchl. *a* (Pigment Nr. 2, Abb. 27) langsamer als Pchl. *a* (Pigment Nr. 1, Abb. 27). Dieses Ergebnis stimmt mit dem Erkenntnis überein, daß Hafer nach Carey & Rebeiz [1985] zu der Pflanzengruppe zählt, die bei Wachstum in der Dunkelheit den „Monovinyl“-Chlorophyllbiosyntheseweg bevorzugt.

Aufgrund der gewonnenen Daten kann kein klarer, interpretierbarer Zusammenhang zwischen den Veränderungen in den Seitenketten des Ringes A und B mit den unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten gesehen werden. Dabei ist zu bedenken, daß diese Veränderungen natürlich auch das π -Elektronensystem des Grundgerüsts beeinflussen. Dies ist anhand der unterschiedlichen Absorptionsspektren (Abb. 32 und 33) deutlich erkennbar und vor dem Hintergrund zu sehen, daß nicht nur die Art und Weise der Bindung des Substrates an die POR die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflussen kann, sondern auch die Anregung des Grundgerüsts durch das Licht hierfür von Bedeutung sein kann. Die in 80 % Aceton bestimmten relativen Fluoreszenz-Quantenausbeuten (Tab. 2) machen deutlich, daß bei den untersuchten Pigmenten die Quantenausbeute sehr unterschiedlich ist. Auffällig ist, daß der Austausch von Mg mit Zn die Quantenausbeute jeweils um ca. 50 % herabsetzt.

Die Fluoreszenz- und Photoreaktion-Quantenausbeute sind jedoch nicht komplementär. So zeigen Pchl. *a* und Pchl. *b* sehr unterschiedliche Absorptionsspektren und ebenso markante Unterschiede in der Fluoreszenz-Quantenausbeute. Die Reaktionsgeschwindigkeiten beider Pigmente sind aber ähnlich hoch und auch die mit 0,47 μM für Pchl. *a*, respektive 0,63 μM für Pchl. *b* bestimmten K_M -Werte (Abb. 37) unterscheiden sich nicht signifikant.

Griffiths [1978] findet für Pchl. *a* einen fast identischen Wert von 0,46 μM . Da dieser Wert an membrangebundener POR bestimmt wurde, läßt sich aus der Übereinstimmung der Werte ableiten, daß die Solubilisierung mit OG nicht zu einer Veränderung der kinetischen Eigenschaften führt.

Die von Reinbothe *et al.* [1999] vermutete höhere Affinität der PORA (in Gerste) für Pchl. *b* gegenüber Pchl. *a* muß aufgrund der annähernd gleichen K_M -Werte für beide Pigmente stark angezweifelt werden, da in diesen Versuchen die POR zu über 90 % als PORA vorliegt.

Auch wenn zu den Ursachen der unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten der photokonvertierbaren Pigmente keine konkreten Aussagen gemacht werden können, bleibt dennoch festzuhalten, daß die strukturellen Veränderungen am Ring A oder am Ring B von der POR toleriert werden.

Die in der Abbildung 28 angeführten Pigmente werden dagegen bei Belichtung nicht reduziert. Neben dem teilweisen Austausch von Mg mit Zn sind diese Pigmente im Vergleich zu Pchl. *a* ausschließlich an den Seitenketten des Ringes B und D oder am Ring E verändert.

Da Zink als Zentralatom kein Kriterium für die mangelnde Eignung als Substrat sein kann, ist die Ursache in den gegenüber Pchl. *a* veränderten Seitenketten zu suchen. Der Austausch der Propionsäure-Gruppe am C_{17} (Ring D) durch eine Acrylsäure-Gruppe (Pigmente Nr. 8-10, Abb. 28) oder einen Propionsäuremethylester (Pigment Nr. 11, Abb. 28) bewirkt den Verlust der Reduzierbarkeit. Nach Griffiths [1980] wäre dies im Fall des Methylesters verständlich, wenn eine ionische Interaktion zwischen der Carboxylatgruppe am C_{17} mit dem Protein an der Bindung beteiligt ist. Die Acrylseitenkette am C_{17} des Chl *c₁* (Pigment Nr. 8, Abb. 28) sollte diese ionische Interaktion jedoch noch ermöglichen, dennoch konnte auch dieses Pigment nicht photoreduziert werden. Eine mögliche Erklärung wäre, daß diese Seitenkette aufgrund der Doppelbindung wesentlich starrer ist. Dies könnte sich dann umso nachteiliger auswirken, wenn in der Bindungstasche der POR sterische Einschränkungen vorliegen. Gleiches kann für

die Pigmente mit Veränderungen am Ring E (Pigmente Nr. 12 bis 14, Abb. 28) gesagt werden. Diese werden ebenfalls nicht von der POR akzeptiert, das heißt bei Belichtung im Enzymtest nicht reduziert.

Helfrich *et al.* [1996] kann darüber hinaus für die am C₁₃² (Ring E) gegenüber Pchlidide *a* veränderten Seitenketten der Pigmente Zn-Pyropropheide *a*, Zn-[13²]-methoxy-Pyropropheide *a*, Zn-[13²-OH]-Propropheide *a* und Zn-[13²]-methoxy-Propropheide *a* keine Photoumwandlung nachweisen. Zumindest für die beiden letztgenannten Pigmente ist eine sterische Behinderung als Ursache ebenfalls denkbar.

Mit Ausnahme der POR in Erbse [Spano *et al.* 1992a] zeigen alle bekannten Aminosäuresequenzen vier konservierte Cysteine. Es wird vermutet, daß eine oder mehrere dieser Cysteine an der Pigmentbindung, oder der Stabilisierung der Proteinstruktur beteiligt sind [Teakle & Griffiths 1993, Lebedev & Timko 1998].

Bekannt ist, daß die Bindung des Co-Substrates NADPH über die 2'-Phosphatgruppe an einen Arginin-Rest in der N-terminalen Region der POR erfolgt [Teakle & Griffiths 1993]. Wilks & Timko [1995] stellen ein Teilmodell für das aktive Zentrum der POR vor (Abb. 39 B). Es beruht auf einem Vergleich der POR mit der kurzkettigen Alkoholdehydrogenase, deren Röntgenstruktur bekannt ist. In der Familie dieser Dehydrogenasen werden die Substrate durch den Hydridtransfer von NAD(P)H reduziert. Der Hydriddonor ist dabei am Boden der Bindungstasche in der Nähe von konservierten Tyrosin- und Lysin-Resten fixiert, wobei diese Reste an der Reaktion durch Protontransfer auf das Substrat beteiligt sind.

Wilks und Timko zeigen gleichfalls die Bedeutung der Reste Tyr275 und Lys279 für die Katalyse durch die POR, da die Mutationen mit Phenylalanin - statt Tyr275 - und Isoleucin - statt Lys279 - den Verlust der Aktivität nach sich ziehen. Aufgrund der Tatsache, daß die Reste mit chemisch ähnlichen Eigenschaften wie Cystein für Tyrosin und Arginin für Lysin, bei entsprechenden Mutationen, diese nicht ersetzen können, schließen Wilks und Timko, daß die Porphyrin-Bindungsseite in der POR wesentlich starrer ist als die Substratbindestelle in Dehydrogenasen, in denen diese Mutationen möglich sind.

In dem Modell von Wilks und Timko ist der Porphyrinring D gegen NADPH und Tyrosin275 fixiert, um den bestmöglichen Hydrid- und Protonentransfer zu ermöglichen. Die Tatsache, daß der Austausch der Propionsäure-Gruppe am Ring D durch eine Acrylsäure-Gruppe oder die Methylester-Gruppe in einem Verlust der Photoreduzierbarkeit dieser Pigmente resultiert, stimmt mit der von Wilks und Timko postulierten Starrheit an dieser Stelle überein.

Alle nicht photoreduzierbaren Pigmente weisen trotz zahlreicher strukturellen Unterschiede letztendlich eine Gemeinsamkeit auf. Sie sind nicht fähig, über eine Keto-Enol-Tautomerie ein Enolat zu bilden. Unabhängig von der Frage, ob die an der Bindung beteiligten Aminosäurereste eine Enolatbildung begünstigen oder nicht, interagiert vermutlich der Ring E mit dem Enzym, da alle Modifikationen hier ebenfalls zu nicht photoreduzierbaren Verbindungen führen (Abb. 28, Komponenten 12-14).

Aus den vorgestellten Ergebnissen geht hervor, daß die Ringe D und E des Porphyrinringes am Boden der Enzymtasche fixiert sind. Auf diese Weise liegen die Ringe A und B mehr oder weniger frei in der Umgebung. Die Ergebnisse mit den photokonvertierbaren Pigmenten würden somit ebenfalls mit der Topographie dieses Modells übereinstimmen. Eine schematische Darstellung des ternären Komplexes, unter Einbeziehung des möglichen Reaktionsablaufes über eine Enolatbildung ist in Anlehnung an das Modell von Wilks & Timko (Abb. 39 B), in der Abbildung 39 A dargestellt.

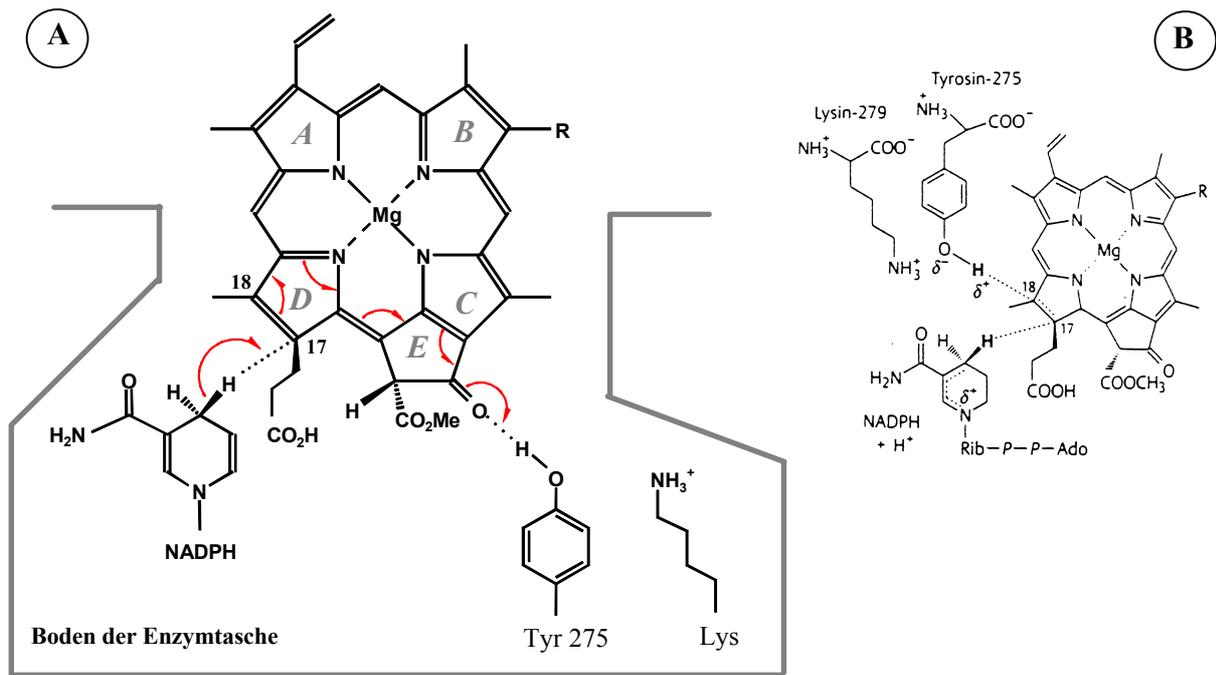


Abb. 39: Modelle zum katalytischen Mechanismus der Photoreduktion von Pchlide *a*

A: Schematisches Modell zur Lokalisation des ternären Komplexes POR-NADPH-Pchlide *a* in der Enzymtasche unter Einbeziehung eines katalytischen Mechanismus über eine Enolatbildung. B: Modell zum Mechanismus der Katalyse nach Wilks & Timko [1995].

3.3 Untersuchungen zu den spektralen Verschiebungen vor, während und nach der Photoreduktion

Im vorangegangenen Kapitel 3.2 wurde die Substratspezifität der pigmentfreien und zur Homogenität aufgereinigten POR aus Hafer untersucht. Der spektrale Verlauf der Photoreduktion in diesem *in vitro* System zeigt, daß die Umwandlung des zugesetzten „natürlichen“ Pigments Pchl a von A634 nm zu Chl a mit einem Absorptionsmaximum bei A672 nm erfolgt.

In der Literatur werden bei *in vivo* Messungen zu der Photoreduktion drei Absorptionsmaxima für Pchl a bei A628, A638 und A650 nm beschrieben. Das nach der Belichtung entstehende Chl a zeigt ebenfalls unterschiedliche Absorptionsmaxima bei A678, A682 und A672 nm, wobei diese Formen zeitabhängig in der angegebenen Reihenfolge ineinander übergehen.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Untersuchungen an vier unterschiedlichen POR-Präparationen (drei Fraktionen der Aufreinigung aus Hafer, sowie in *E.coli* überexprimierte und weitgehend aufgereinigte POR aus Erbse) sollen zeigen, ob und unter welchen Bedingungen in diesen *in vitro* Systemen die spektroskopischen Eigenschaften der Pigmente vor, während und nach der Photoreduktion mit denen der *in vivo* beschriebenen vergleichbar sind.

Bei der Interpretation der Pigmentkonzentrationsangaben in den Legenden der folgenden Abbildungen ist zu berücksichtigen, daß *in vitro* in der Regel ca. 38 % bis 45 % des endogenen Pchl a (A631 nm) nicht reduziert werden. Eine Racemisierung des endogenen Pchl a durch die Isolierungsbedingungen ist unter anderem als Ursache denkbar. Werden exogene Pigmente in den Versuchen verwendet, ist ein noch höherer Prozentsatz nicht photokonvertierbar, da diese Pigmente als Racemat eingesetzt werden.

Die Enzymtests werden einheitlich in 30 % Glycerinpuffer, bzw. in 80 % Glycerinpuffer (2.8.3.1) durchgeführt. Die Belichtung erfolgt, wie auch schon bei den Enzymtests zur Substratspezifität mit Weißlicht.

3.3.1 Die Etioplastenfraktion „ET“

3.3.1.1 Der spektrale Verlauf in 30 % Glycerin

Der spektrale Verlauf der Photoreduktion von Pchlid *a* in der Etioplastenfraktion ist in Abbildung 40 dargestellt. Die Etioplastenmembranen (2.8.3.1) sind hierbei in 30 % Glycerinpuffer resuspendiert. Bei Belichtung erfolgt die Umwandlung des photokonvertierbaren Anteils von Pchlid *a* (Absorptionsmaximum bei A643 nm) zu Chlid *a* mit einem, während der Belichtungsschritte, durchgehend bei A680 nm liegendem Absorptionsmaximum.

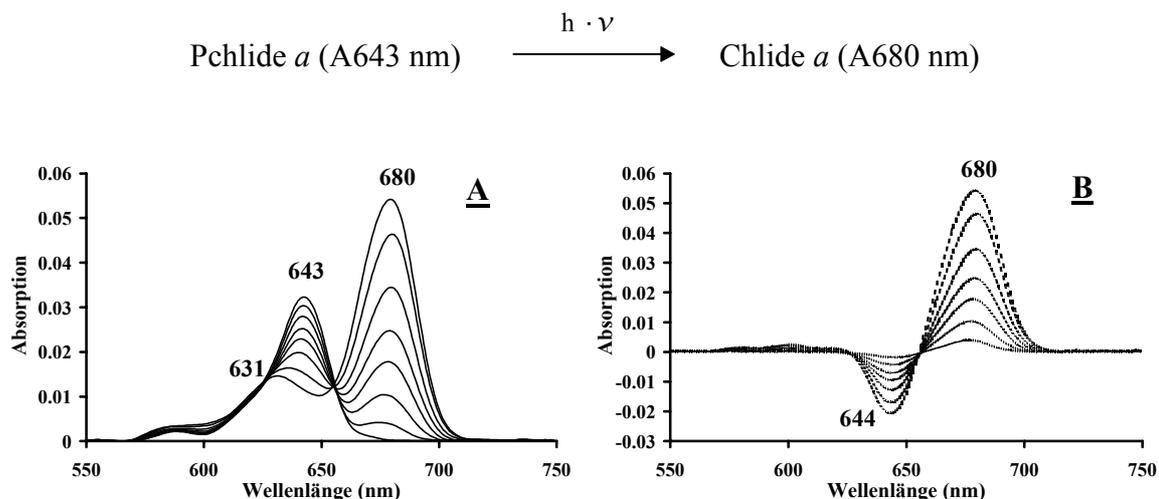
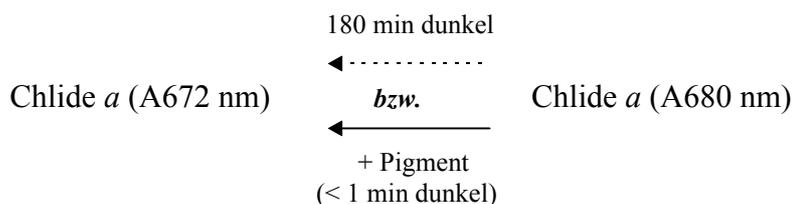


Abb. 40: Die Photoreduktion von Pchlid *a* in der Etioplastenfraktion in 30 % Glycerinpuffer

A: Die Spektren zeigen die Abnahme der Absorption von Pchlid *a* (1,39 nmol) mit einem Maximum bei A643 nm und die Zunahme der Absorption von Chlid *a* (0,86 nmol) mit einem Maximum bei A680 nm im Verlauf der Photoumwandlung. Die Belichtung erfolgt für 0, 5, 15, 30, 50, 90, 200 und 720 s bei einer Lichtintensität von $3,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Der nicht photokonvertierbare Anteil des Pchlid *a* zeigt ein Absorptionsmaximum bei A631 nm.

B: Differenzspektren zu A zwischen den Spektren der Probe nach den jeweiligen Belichtungsschritten zu dem Spektrum der unbelichteten Probe.

Nachdem in der Folge selbst bei stark erhöhten Lichtintensitäten (30-fach) kein neues Chlid *a* mehr gebildet wird, und die Reaktion damit vollständig abgelaufen ist, wird die Probe bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen. Während eines Zeitraumes von bis zu 180 Minuten verschiebt sich dabei das Maximum des Chlid *a* von A680 nm kürzerwellig zu A672 nm (Abb. 41, A und B). Diese Verschiebung kann jedoch auch in kürzester Zeit erfolgen, wenn Pchlid *a* oder ein analoges Pigment nach der Probenbelichtung zugegeben wird (Abb. 41, C und D).



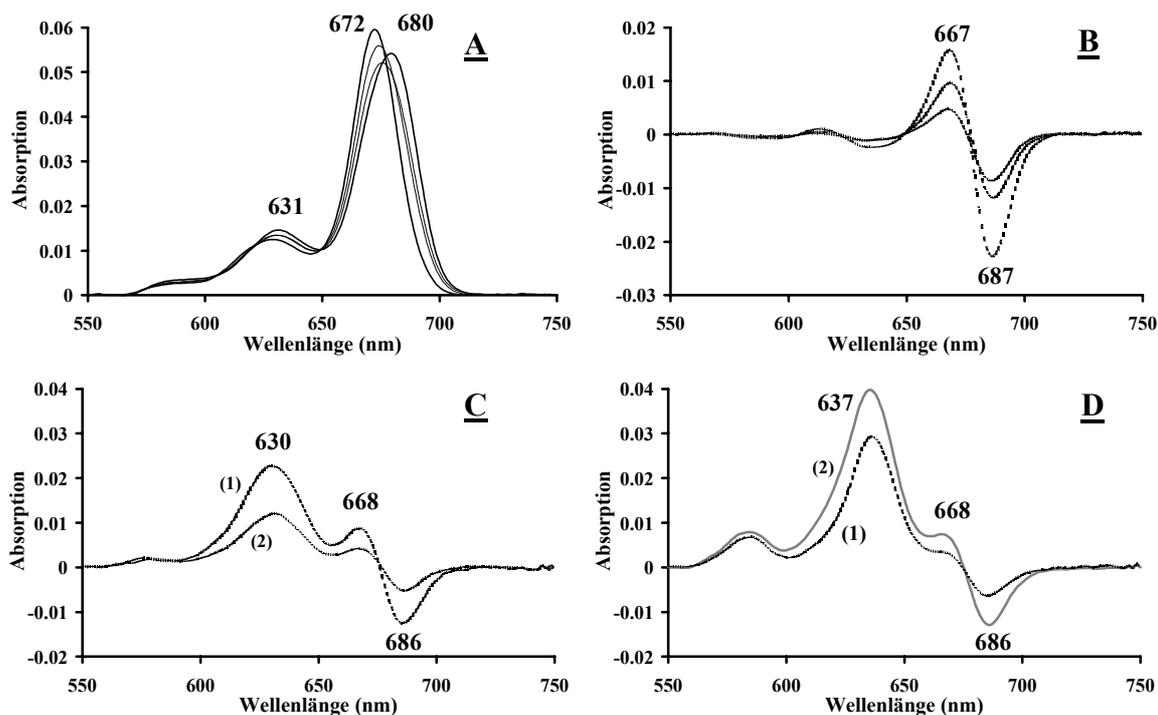


Abb. 41: Die Verschiebung des Chlide *a* Absorptionsmaximums

A: Verlauf der Verschiebung des Chlide *a* Maximums von A680 nm zu A672 nm. Die Inkubationszeiten der Probe im Dunkeln betragen 0, 30, 60 und 180 min.

B: Differenzspektren (zu A) der inkubierten Probe jeweils zu $t = 0$ min.

C: Differenzspektren zu dem Spektrum einer vollständig belichteten Probe (Abb. 40, A „680 nm“) unmittelbar ($t < 1$ min) nach Zugabe von 1,2 nmol (1), bzw. 0,64 nmol (2) Zn-Protopheide *a*.

D: Differenzspektren zu dem Spektrum einer vollständig belichteten Probe (Abb. 40, A „680 nm“) unmittelbar ($t < 1$ min) nach Zugabe von 1,3 nmol (1) Chl *c*₁ und nachfolgend ($t < 5$ min) 0,61 nmol Zn-Protopheide *a* (2, Differenzspektrum 1 ist hier einbezogen).

Das Ausmaß der Verschiebung nach Pigmentzugabe ist von der zugesetzten Pigmentmenge und der Eignung des Pigments als Substrat für die POR abhängig.

In der Abbildung 41 C wird deutlich, daß in Relation gesehen (Vergleich Spektrum 1 mit Spektrum 2), die Zugabe von 47 % weniger Pigment (Spektrum 2), hier Zn-Protopheide *a*, von einer um ca. 45 prozentig geringeren Verschiebung (686 nm zu 668 nm) begleitet wird. Die Pigmente werden in DMSO (0,7 % [v/v]) angeboten. Kontrollversuche zeigen in dieser Konzentration nur einen vernachlässigbaren Einfluß des Lösungsmittels auf die Verschiebung. Bietet man Chl *c*₁ an, ist ebenfalls eine sofortige Verschiebung zu beobachten (Abb. 41 D, Spektrum 1). Dieses Pigment ist zwar kein photoreduzierbares Substrat für die POR, jedoch scheint es als kompetitiver Hemmstoff für die POR geeignet zu sein (Punkt 3.2.5). Gegenüber einer vergleichbaren Menge an Substrat (Abb. 41 C, Spektrum 1) fällt die Verschiebung um einen Faktor von circa 2 weniger ausgeprägt aus. Bietet man dieser Probe zusätzlich Zn-Protopheide *a* an (Abb. 41 D, Spektrum 2), setzt sich die Verschiebung augenblicklich fort.

3.3.1.2 Der spektrale Verlauf in 80 % Glycerin

Das Absorptionsmaximum von Pchlid *a* und in der Folge der spektroskopische Verlauf der Photoreduktion verändert sich deutlich, wenn die Glycerinkonzentration in der Probe auf 80 % (2.8.3.1) erhöht wird.

Nach einer Dialyse gegen den entsprechenden Puffer verschiebt sich das Absorptionsmaximum von A643 nm auf A650 nm (Abb. 42). Durch den Entzug von Wasser erfolgt während der Dialyse eine Konzentrierung der Probe. Eine Rückverdünnung mit 80 % Glycerinpuffer auf das ursprüngliche Volumen vor der Dialyse, aber auch eine weitergehende Verdünnung mit diesem Puffer, bleiben ohne Einfluß auf die langwellige Absorption des Pchlid *a* bei A650 nm.

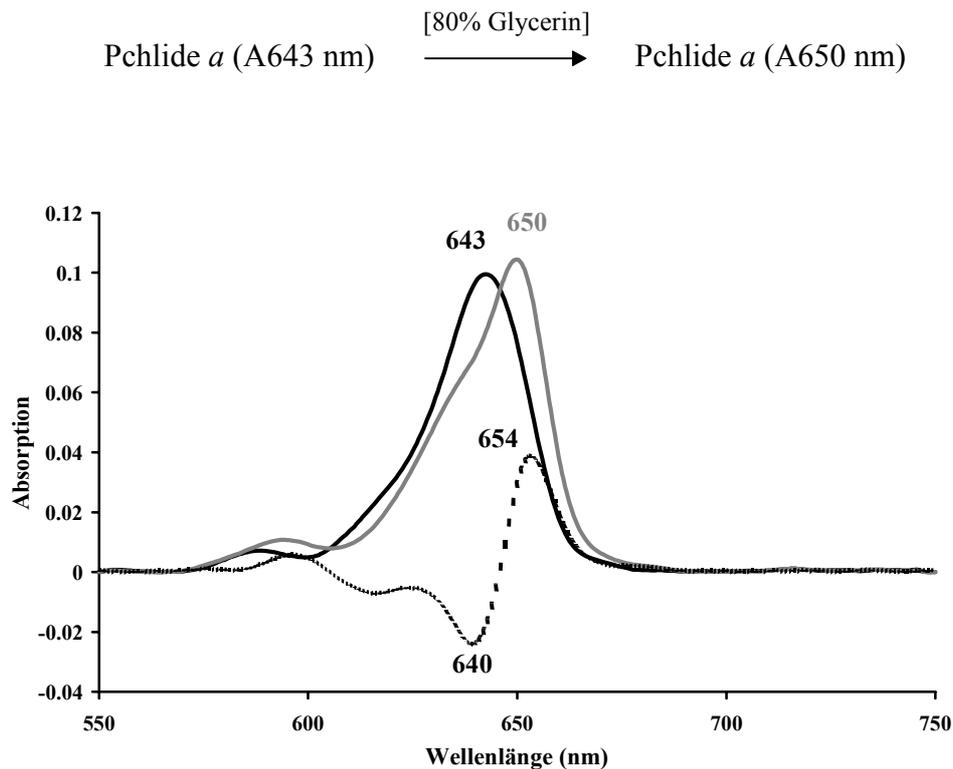
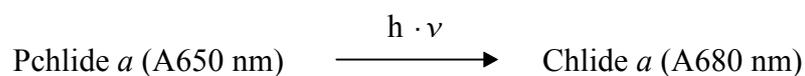


Abb. 42: Absorptionsmaxima von Pchlid *a* in Abhängigkeit von der Glycerinkonzentration

Das schwarze Spektrum zeigt Pchlid *a* (4,15 nmol) in Etioplasten mit 30 % Glycerin im Puffer. Nach Dialyse gegen einen Puffer mit 80 % Glycerin und entsprechender Wiederherstellung des Volumens vor der Dialyse (siehe Text) ergibt sich das graue Spektrum. Die gestrichelte Kurve zeigt das entsprechende Differenzspektrum.

In der 80 % Glycerin-Probe wird bei Belichtung spektroskopisch die Abnahme von Pchlid *a* (A650 nm) und die gleichzeitige Bildung von Chlid *a* (A680 nm) beobachtet (Abb. 43, A und B). Der nicht photokonvertierbare Anteil an Pchlid *a* zeigt ein Maximum bei A631 nm.



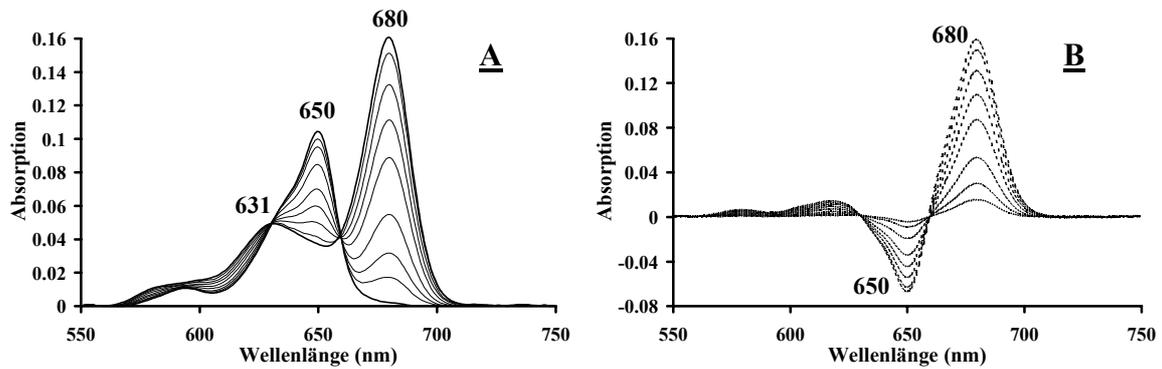
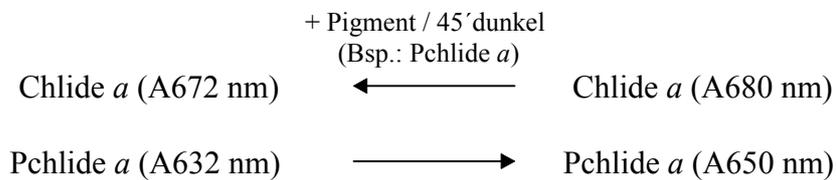


Abb. 43: Die Photoreduktion von Pchl *a* in der Etioplastenfraktion in 80 % Glycerinpuffer

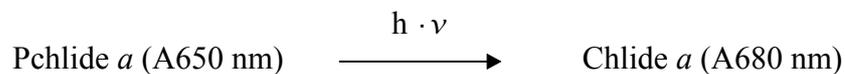
- A: Die Spektren zeigen die Abnahme der Absorption von Pchl *a* (4,15 nmol) mit einem Maximum bei A650 nm und die Zunahme der Absorption von Chlide *a* (2,55 nmol) mit einem Maximum bei A680 nm im Verlauf der Photoumwandlung. Die Belichtung erfolgt für 0, 5, 10, 20, 40, 60, 90, 150 und 270 s bei einer Lichtintensität von $3,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.
- B: Differenzspektren zu A zwischen den Spektren der Probe nach den jeweiligen Belichtungsschritten zu dem Spektrum der unbelichteten Probe.

Die Lage des Maximums von Chlide *a* bei A680 nm verändert sich bei langer Inkubationszeit (150 min) im Dunkeln nur leicht. Im Differenzspektrum (Abb. 43 B) ist eine geringfügige kurzwellige Verschiebung zu beobachten.

Eine schnellere Verschiebung von A680 nm auf A672 nm erfolgt durch Zusatz von exogenem Pigment. Im Gegensatz zu Proben in 30 % Glycerin benötigt diese Verschiebung (Abb. 44, E und F) bis zu ihrem Endpunkt bei A672 nm jedoch wesentlich länger (etwa 45 Minuten). Parallel hierzu bildet sich aus einem kurzwelligen Anteil des zugegebenen Pigments (hier Pchl *a*, 632 nm) ein längerwelliger Anteil bei A650 nm aus.



Nur diese langwellige Form wird durch Belichtung zu Chlide *a* mit einem Maximum bei A680 nm umgewandelt (Abb. 44, G und H). Der kurzwellige Anteil des Pchl *a* (A632 nm) bleibt unverändert.



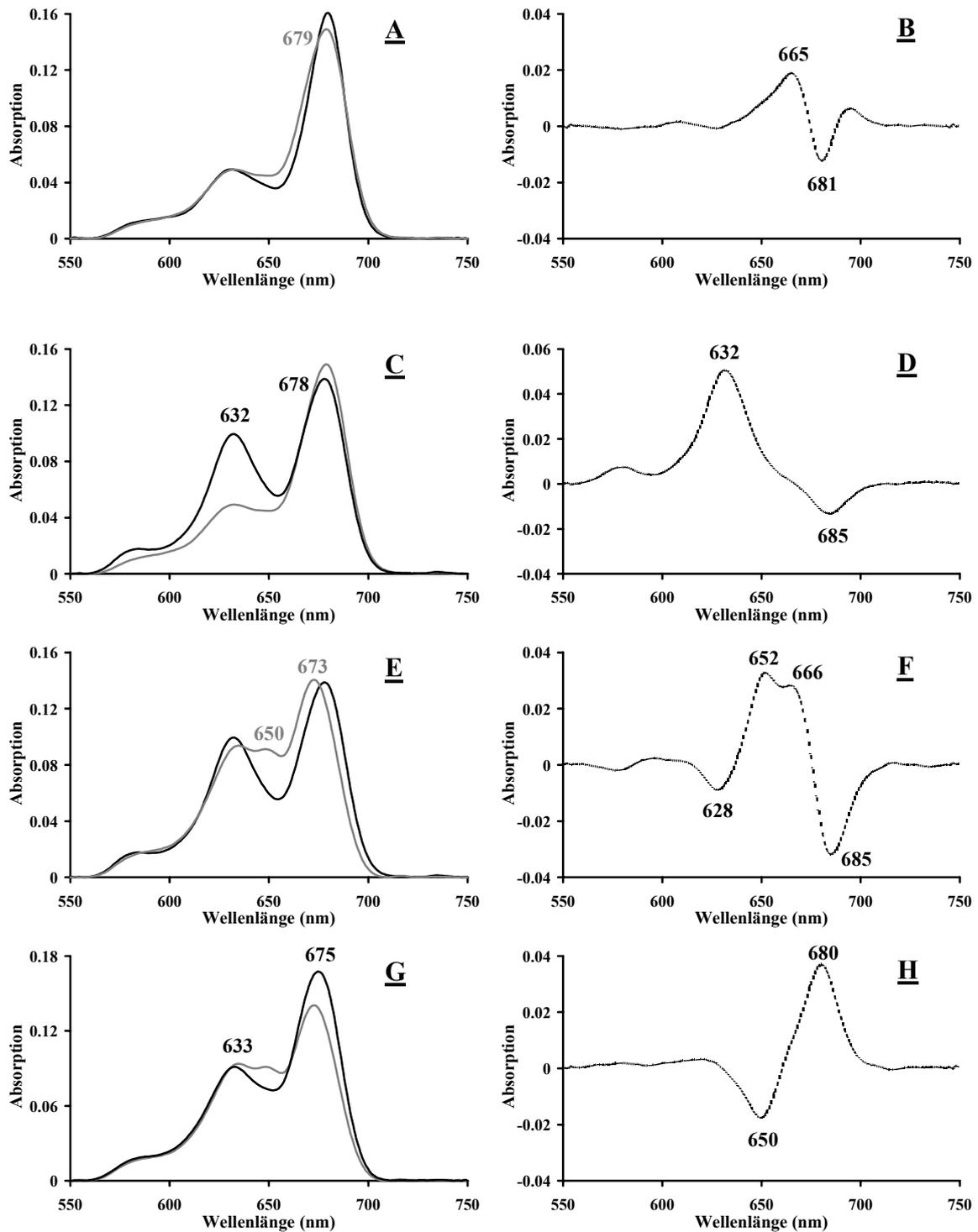


Abb. 44: Die Verschiebung des Chlide *a* Absorptionsmaximums

- A: Geringfügige Verschiebung des Chlide *a* Maximums bei A680 nm (schwarz, siehe auch Abb. 43) zu A679 nm (grau) während einer Inkubationszeit der Probe im Dunkeln von 150 min. B: Differenzspektrum zu A.
- C: Spektrum unmittelbar nach Zugabe von 2,1 nmol Pchlide *a* (schwarz) zu der für 150 min im Dunkeln inkubierten Probe (grau). D: Differenzspektrum zu C.
- E: Spektrum (grau) der nach der Pchlide *a* Zugabe (schwarz) für 45 min im Dunkeln inkubierten Probe. F: Differenzspektrum zu D.
- G: Spektrum (schwarz) nach Belichtung des neu entstandenen photoreduzierbaren Anteils des Pchlide *a* (grau) bei 650 nm für 90 s bei $3,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. H: Differenzspektrum zu G.

3.3.2 Die Fraktion „Ü3“

Die folgenden Untersuchungen sollen unter anderem zeigen, ob und inwieweit der spektrale Verlauf durch die Solubilisierung der Pigmente und der POR in der Fraktion Ü3 gegenüber dem Verlauf in der Etioplastenfraktion verändert wird.

3.3.2.1 Der spektrale Verlauf in 30 % Glycerin

Der spektrale Verlauf der Photoreduktion von Pchlid *a* nach Solubilisierung von Pigment und POR in der Fraktion Ü3 (2.3.1) unterscheidet sich in einem Punkt merklich von dem Verlauf in der Etioplastenfraktion. Unter vergleichbaren Bedingungen hinsichtlich der Pufferzusammensetzung und der Belichtungsintensität ist während der Belichtungsintervalle deutlich eine Verschiebung der Absorptionsmaxima des entstehenden Chlids *a* zu beobachten. In der Etioplastenfraktion erfolgt die Umsetzung von Pchlid *a* während der Belichtungsintervalle zu Chlid *a* mit einem Maximum bei durchgehend A680 nm (Abb. 40). Wie aus der Abbildung 45, A und B deutlich zu entnehmen ist, bildet sich in der Fraktion Ü3 nach der ersten Belichtung zunächst die kürzerwellige Form von Chlid *a* bei A672 nm aus. Diese Umwandlung erfolgt dabei vornehmlich aus einem ebenfalls kürzerwelligem Anteil des Pchlids *a* zwischen A636 nm bis A638 nm. Während der fortschreitenden Belichtung verschiebt sich das Maximum von Chlid *a* zunehmend bis hin zu A680 nm.

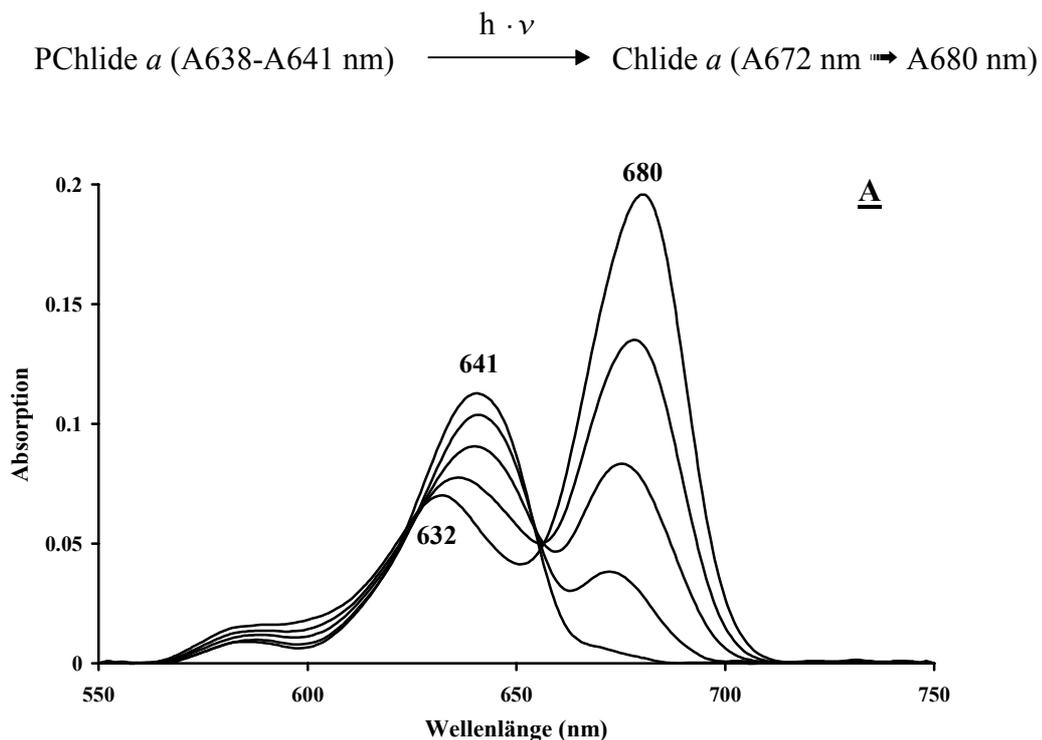


Abb. 45: Die Photoreduktion von Pchlid *a* in der Fraktion Ü3 in 30 % Glycerinpuffer.

A: Die Spektren zeigen die Abnahme der Absorption von Pchlid *a* (4,7 nmol) mit einem Maximum bei A641 nm und die Zunahme der Absorption von Chlid *a* (3,2 nmol) mit einem Maximum zwischen A672 nm und A680 nm im Verlauf der Photoumwandlung. Die Belichtung erfolgt für 0, 20, 60, 120, 150 und 1200 s bei einer Lichtintensität von $3,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

B: (siehe Seite 95)

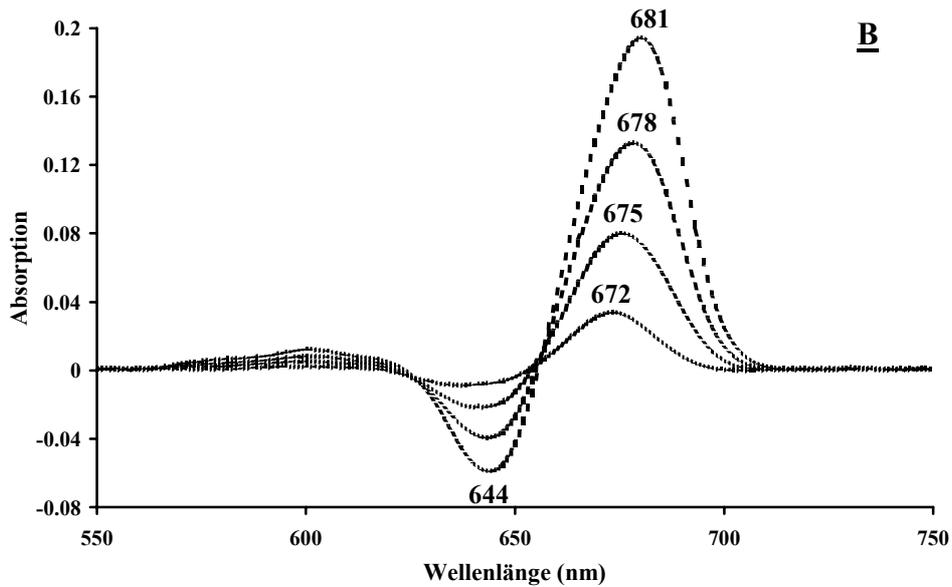


Abb. 45: Die Photoreduktion von Pchl *a* in der Fraktion Ü3 in 30 % Glycerinpuffer.

A: (siehe Seite 94)

B: Differenzspektren zu A zwischen den Spektren der Probe nach den jeweiligen Belichtungsschritten zu dem Spektrum der unbelichteten Probe.

Im Gegensatz zu der Situation in Etioplasten (Abb. 41, A und B), verändert sich die Lage des Absorptionsmaximums von Chlide *a* (A680 nm) in der Fraktion Ü3 durch eine längere Inkubation im Dunkeln (180 min) nicht. Eine schnelle kurzzeitige Verschiebung des Chlide *a* Maximums von A680 nm zurück auf A672 nm ist jedoch, ebenso wie in der Etioplastenfraction (Abb. 41, C und D), durch Zugabe von exogenem Pigment zu bewirken. Die Abbildung 46 stellt diese Verschiebung dar.

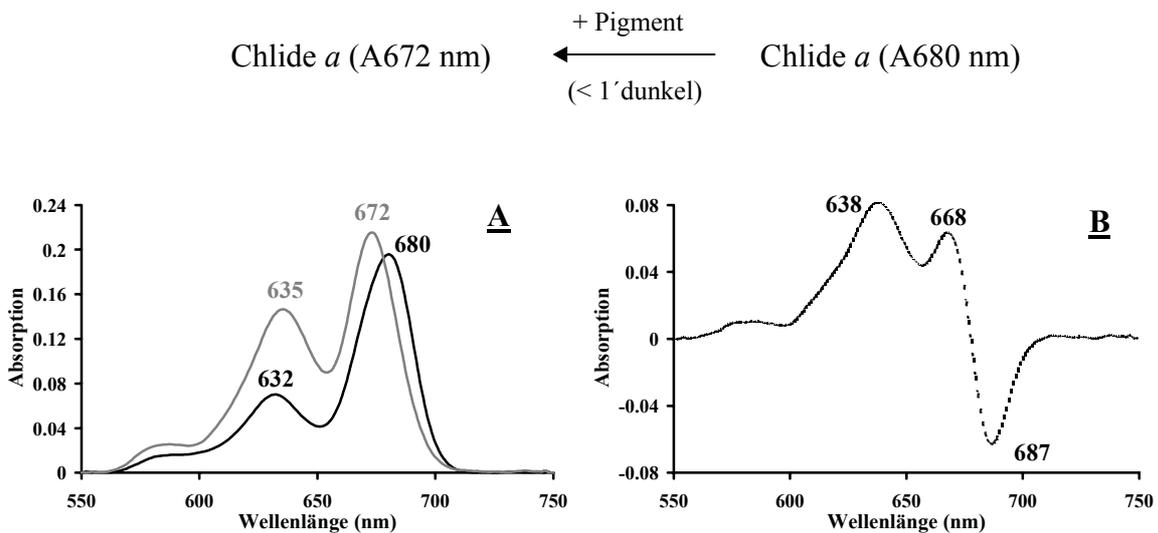


Abb. 46: Die Verschiebung des Absorptionsmaximums von Chlide *a* nach Zugabe von exogenem Pigment in 30 % Glycerinpuffer

A: Spektrum der belichteten Probe (schwarz, siehe auch Abb. 45), Spektrum nach Zugabe von 5,9 nmol Pchl *a* (grau).

B: Differenzspektrum zu A.

3.3.2.2 Der spektrale Verlauf in 80 % Glycerin

3.3.2.2.1 UV/Vis-Spektroskopie

Nach einer Erhöhung der Glycerinkonzentration in der Fraktion Ü3 von 30 % auf 80 % durch Dialyse zeigen sich (Abb. 47), bezüglich der Verschiebung der längerwelligen Verschiebung des Pchlides *a* Maximums, die gleichen Effekte wie bei der entsprechenden Behandlung einer Etioplastenfraktion (Abb. 42). Die Rückdialyse der Probe von 80 % Glycerin auf 30 % Glycerin bewirkt eine Verschiebung von A649 nm zurück auf A641 nm. Der gesamte Vorgang ist somit reversibel und durch die Glycerinkonzentration beeinflusst.

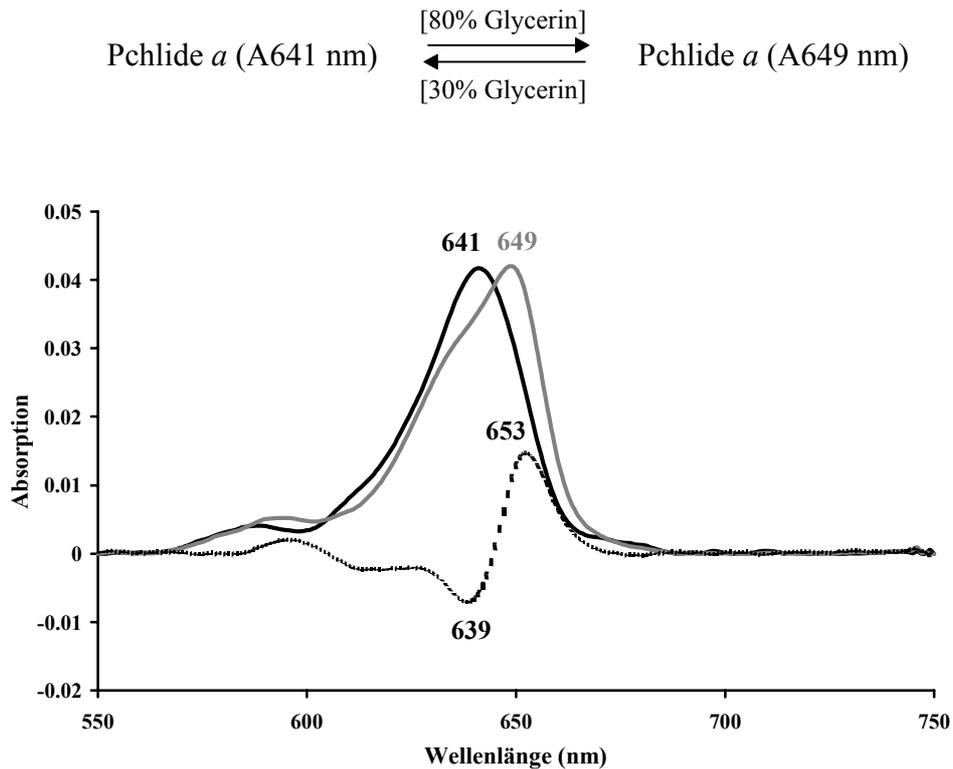
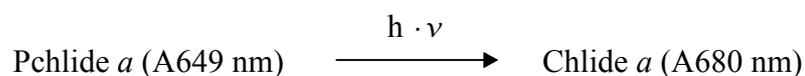


Abb. 47: Absorptionsmaxima von Pchlid *a* in Abhängigkeit von der Glycerinkonzentration in der Fraktion Ü3.

Das schwarze Spektrum zeigt Pchlid *a* (1,8 nmol) in der Fraktion Ü3 in 30 % Glycerinpuffer. Nach der Dialyse gegen einen Puffer mit 80 % Glycerin und entsprechender Wiederherstellung des Volumens vor der Dialyse (durch Verdünnung mit 80 % Glycerinpuffer) ergibt sich das graue Spektrum. Die gestrichelte Kurve zeigt das entsprechende Differenzspektrum.

Die Rückdialyse einer unverdünnten Probe von 80 % auf 30 % Glycerin führt zu dem ursprünglichen Spektrum (schwarz).

Ein Unterschied im Verlauf der Photokonversion bei Belichtung ist zwischen der Etioplastenfraktion und der Fraktion Ü3 nicht festzustellen. Die Umwandlung erfolgt zu Chlide *a* mit einem Maximum bei durchgehend A680 nm (Abb. 48). Kürzerwellige Formen werden während der Belichtungsintervalle nicht beobachtet.



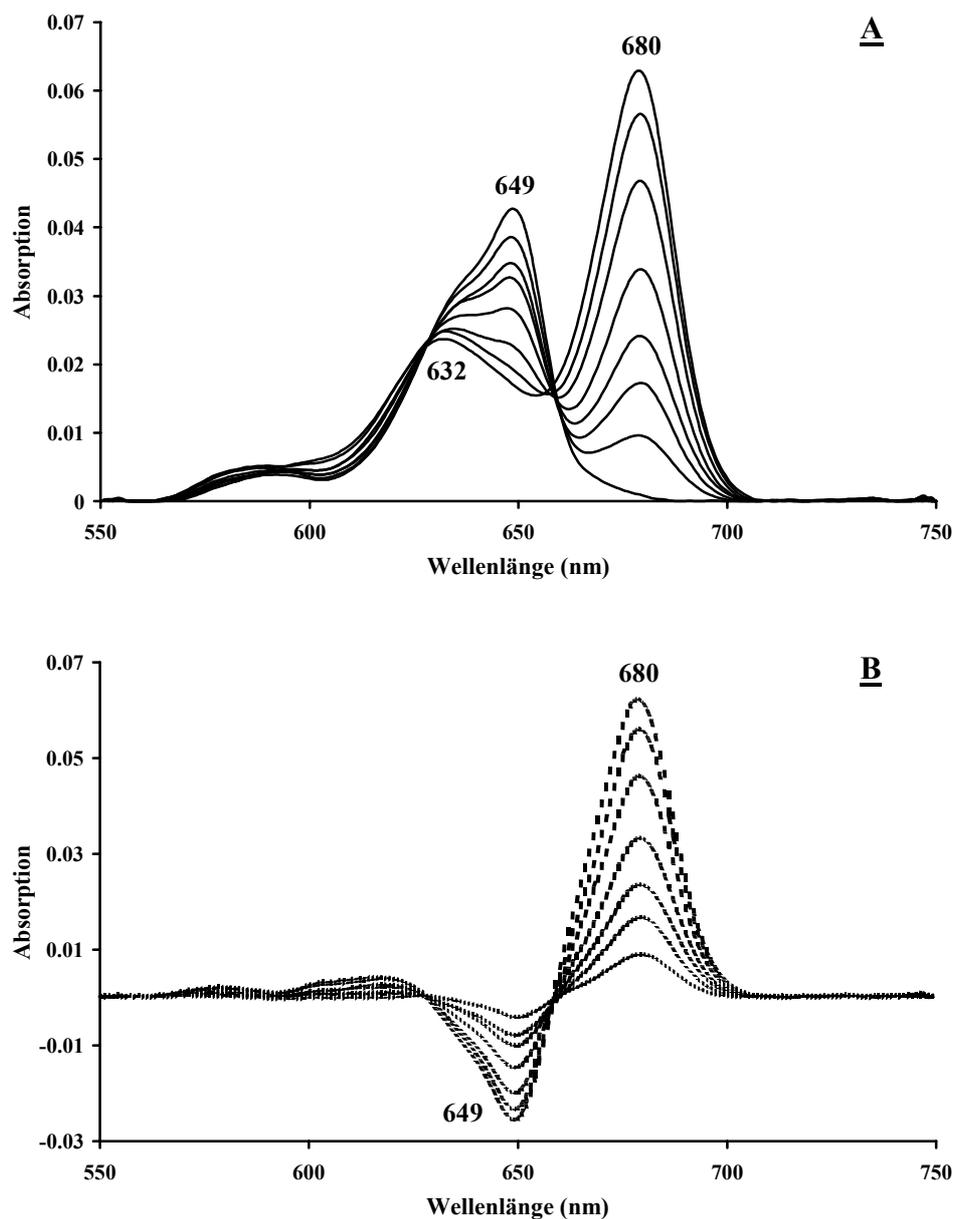


Abb. 48: Die Photoreduktion von Pchl *a* in der Fraktion Ü3 in 80 % Glycerinpuffer

A: Die Spektren zeigen die Abnahme der Absorption von Pchl *a* (1,8 nmol) mit einem Maximum bei A649 nm und die Zunahme der Absorption von Chl *a* (1,0 nmol) mit einem Maximum bei A680 nm im Verlauf der Photoumwandlung. Die Belichtung erfolgt für 0, 20, 40, 60, 100, 180, 360 und 840 s bei einer Lichtintensität von $3,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

B: Differenzspektren zu A zwischen den Spektren der Probe nach den jeweiligen Belichtungsschritten zu dem Spektrum der unbelichteten Probe.

Im Gegensatz zu der Etioplastenfraktion in 80 % Glycerin bleibt die Lage des Maximum des gebildeten Chl *a* bei A680 nm während einer Inkubation im Dunkeln nicht weitgehend konstant. Ohne daß es einer Pigmentzugabe bedarf verschiebt es sich binnen 90 min auf A672 nm (Abb. 49 und 50). Parallel zu dieser Verschiebung bildet sich bei A649 nm ein neuer Anteil von photokonvertierbarem Pchl *a* aus. Aus den Differenzspektren der Abbildung 49 B und 50 B geht hervor, daß diese Neubildung zu Lasten des nicht photokonvertierbaren Anteils (negatives Maximum bei A629 bis A630 nm) geht. Ein Vergleich zwischen einer Probe, die zu 100 % photokonvertiert (Abb. 49) ist, mit einer Probe

bei der dies nur zu 50 % der Fall ist (Abb. 50), zeigt ein mengenmäßig unterschiedliches Ausmaß der Verschiebung des Chlide *a*. Aus den zugehörigen Differenzspektren ist ersichtlich, daß die Verschiebung des Chlide *a* Maximums von A682/683 nm \rightarrow A665/666 nm in der vollständig konvertierten Probe um einen Faktor von ca. 1,5 gegenüber der zur Hälfte konvertierten Probe erhöht ist. Die Regeneration des Anteils an photokonvertierbarem Pchlode *a* ist jedoch in beiden Fällen in gleichem Ausmaß gegeben.

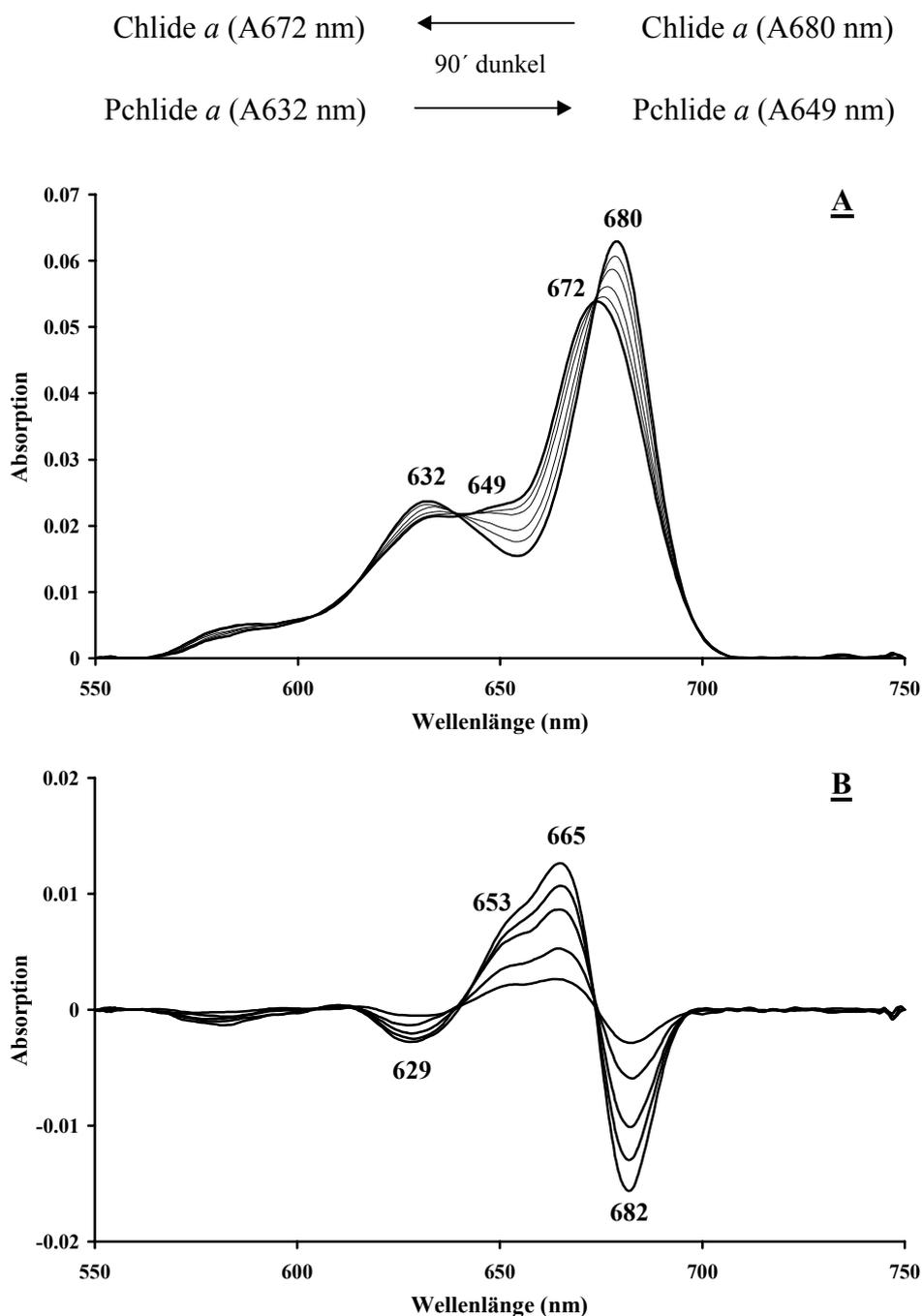


Abb. 49: Die Verschiebung des Absorptionsmaximums von Chlide *a* durch Inkubation im Dunkeln sowie die Regeneration von photoreduzierbarem Pchlode *a* nach vollständiger Belichtung.

A: Verlauf der Verschiebung des Chlide *a* Maximums von A680 nm zu A672 nm und gleichzeitige Regeneration des Pchlode *a* Maximums bei A649 nm ausgehend von der Pchlode *a* Absorption bei A629 nm. Die Inkubationszeiten der Probe betragen im Dunkeln 0, 10, 20, 40, 60 und 90 min.

B: Differenzspektren der inkubierten Probe jeweils zu $t = 0$ min.

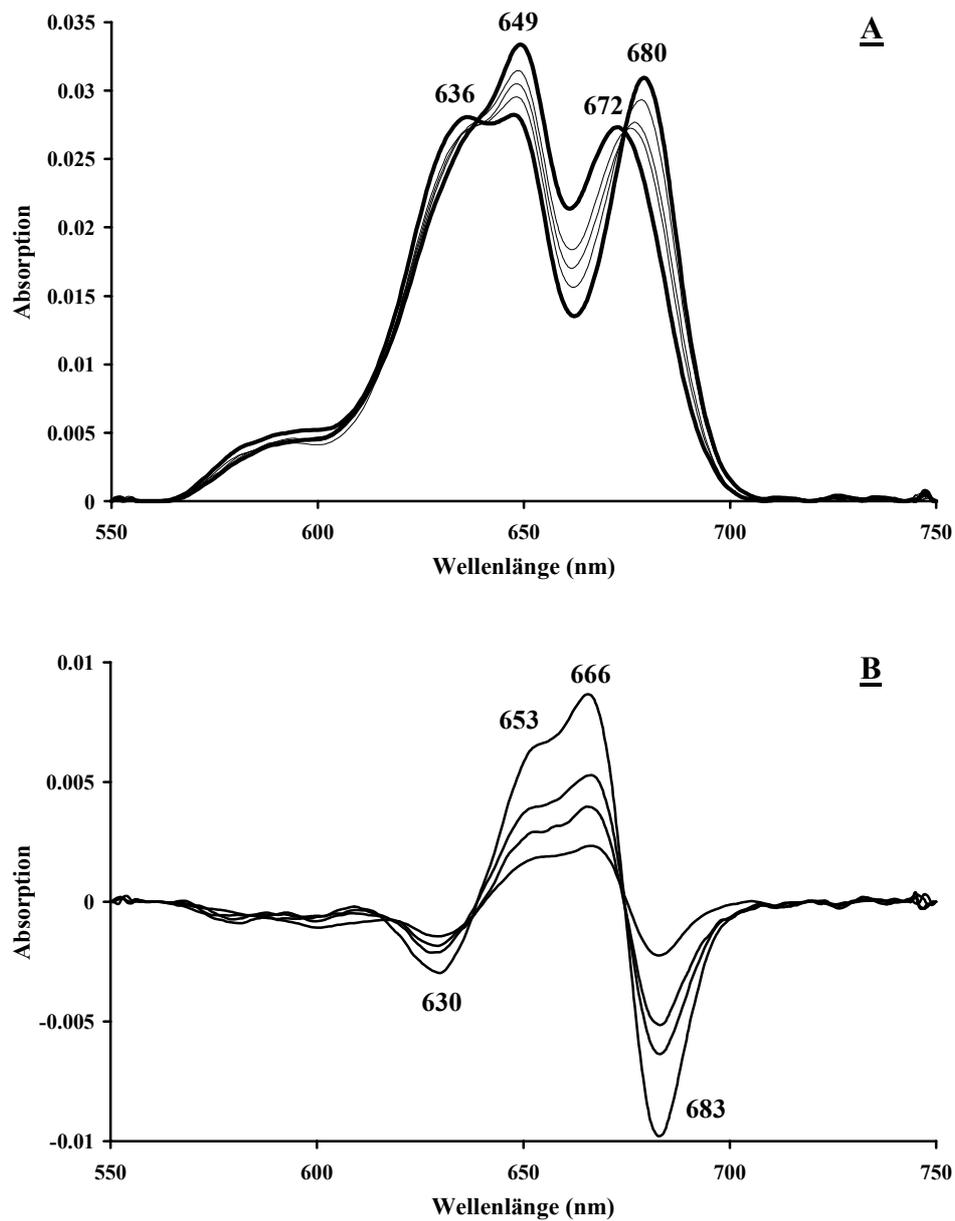


Abb. 50: Die Verschiebung des Absorptionsmaximums von Chlide *a* durch Inkubation im Dunkeln sowie die Regeneration von photoreduzierbarem Pchl *a* nach 50 %-iger Belichtung.
 A: Verlauf der Verschiebung des Chlide *a* Maximums bei A680 nm zu A672 nm und gleichzeitige Regeneration des Pchl *a* Maximums bei A649 nm ausgehend von der Pchl *a* Absorption bei A630 nm. Die Inkubationszeiten der Probe betragen im Dunkeln hier 0, 15, 30, 45 und 90 min.
 B: Differenzspektren der inkubierten Probe jeweils zu t = 0 min.

3.3.2.2.2 Tieftemperatur-Fluoreszenzmessungen

Bei Tieftemperatur-Fluoreszenzmessungen mit den in 3.3.2.2.1 beschriebenen Proben der Fraktion Ü3 in 80 % Glycerinpuffer (Abb. 49 und 50) soll sich zeigen, ob Pchlid *a* mit seinem Absorptionsmaximum bei A649 nm in sehr enger räumlicher Umgebung zu dem bei der Belichtung gebildeten Chlide *a* mit dem Maximum bei A680 nm steht. Ist dies der Fall, kann bei entsprechender Anregung des Edukts eine Energieübertragung auf das Produkt möglich und spektroskopisch zu erfassen sein. Die Emissionsspektren der unbelichteten und der vollständig belichteten Probe (vor einer kurzzeitigen Verschiebung des Chlide *a* Maximums) bei einer Anregungswellenlänge von F450 nm sind in der Abbildung 51 B gezeigt. Bei dieser Wellenlänge erfolgt, wie aus den Exitationsspektren in Abbildung 51 A hervorgeht, eine nahezu maximale Anregung für Edukt und Produkt.

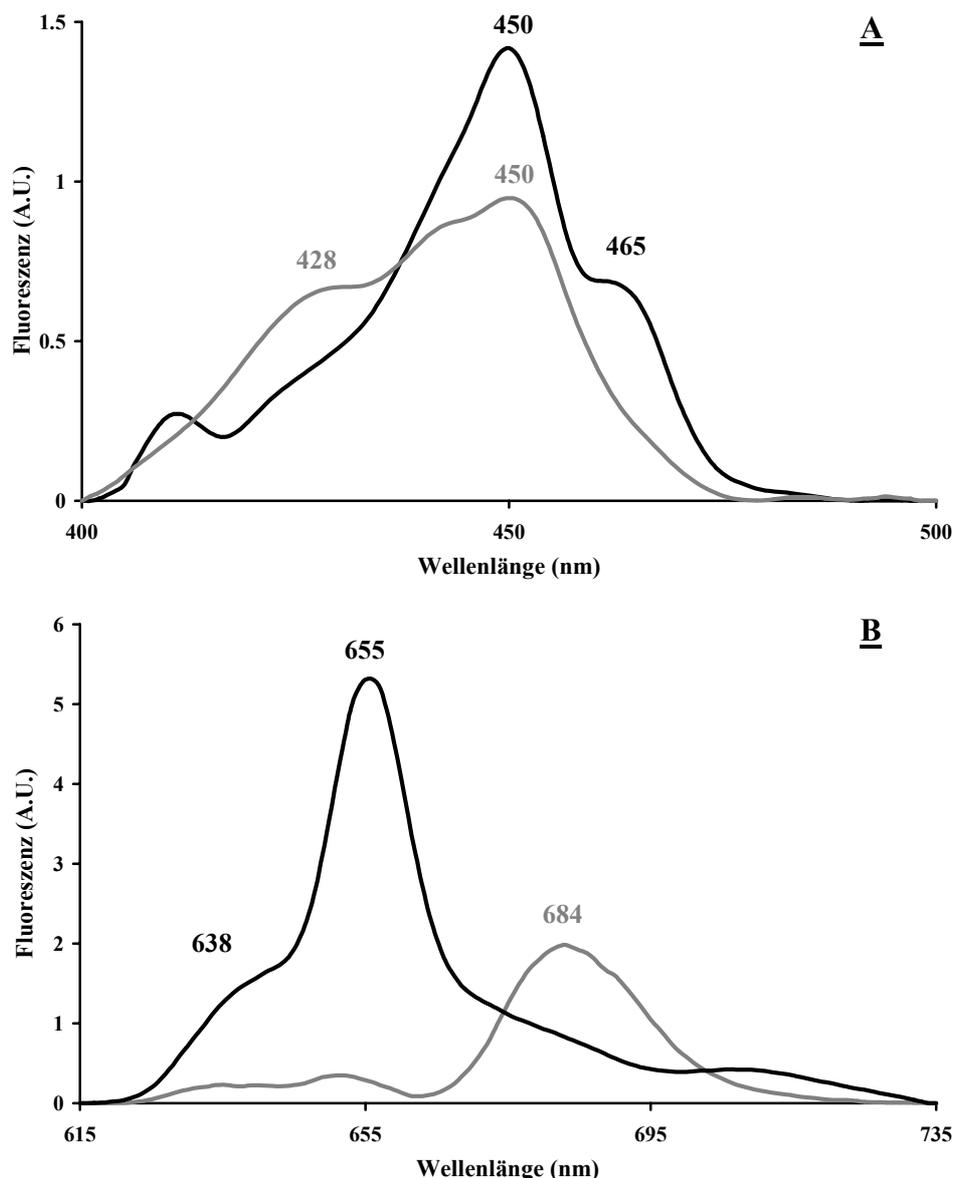


Abb. 51: 77 K-Fluoreszenzspektren einer unbelichteten Probe und einer vollständig belichteten Probe der Fraktion Ü3 in 80% Glycerin

A: Exitationsspektren bei einer Emissionswellenlänge von F657 nm (schwarz, unbelichtete Probe), sowie F687 nm (grau, vollständig belichtete Probe).

B: Emissionsspektren bei einer Exitationwellenlänge von F450 nm, (schwarz, unbelichtete Probe, sowie grau, vollständig belichtete Probe).

Mischt man diese Proben im Verhältnis 1:1 und vergleicht das Emissionsspektrum dieser Mischung mit dem Spektrum der Probe, die zu exakt 50 % photokonvertiert wurde (vor einer kurzwelligen Verschiebung des Chlide *a* Maximums), zeigt sich ein deutlicher Unterschied im Verhältnis der Emissionen von Pchlide *a* zu Chlide *a* (Abb. 52).

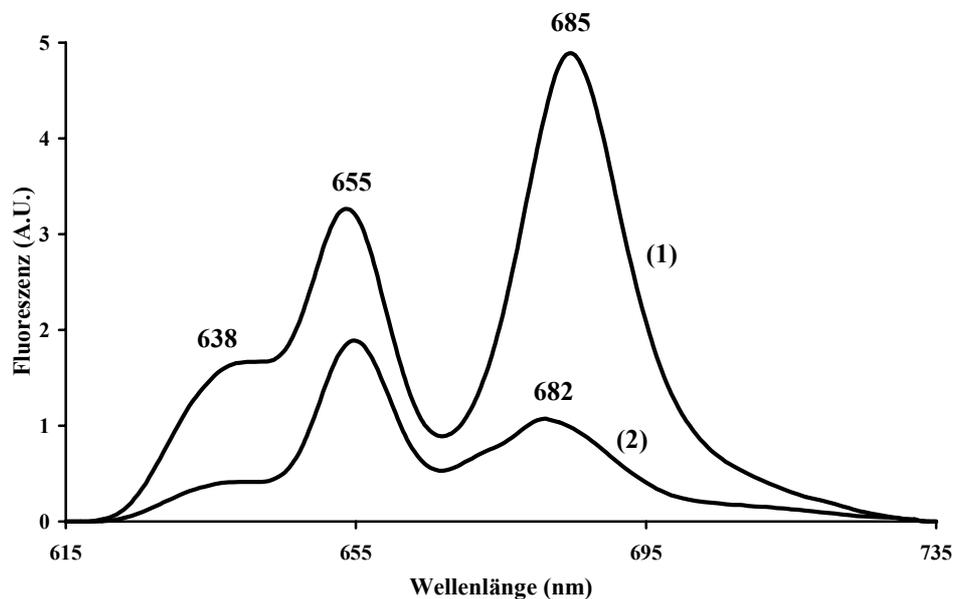


Abb. 52: 77 K-Fluoreszenzspektren einer zu 50 % belichteten Probe sowie einer 1:1 Mischung zwischen einer vollständig belichteten und einer unbelichteten Probe der Fraktion Ü3 in 80% Glycerin.

Emissionsspektren bei einer Exitationswellenlänge von 450 nm; das Spektrum 1 zeigt die zu 50 % belichtete Probe (siehe auch Abb. 50), das Spektrum 2 die 1:1 Mischung.

In drei unabhängigen Versuchen dieser Art ergibt sich für das Verhältnis von Chlide *a* zu Pchlide *a* aus den zu 50 % umgewandelten Proben ein Mittelwert von $1,49 \pm 0,10$. In den 1:1-Mischungen der vollständig belichteten mit den unbelichteten Proben beträgt dieses Verhältnis im Mittel nur $0,63 \pm 0,07$. Eine Energieübertragung von Pchlide *a* auf Chlide *a* in der zu 50 % umgewandelten Probe ist somit deutlich detektierbar.

3.3.2.3 Der spektrale Verlauf nach längerer Probenlagerung ohne NADPH in 30 % Glycerin

Die bisher gezeigten unterschiedlichen Verläufe der Photoreduktion in Abhängigkeit vom Probenmaterial und den Glycerinkonzentration in den Proben zeigten die Umwandlung von längerwelligen Pchlide *a* Formen (A641/642 nm und A649/650 nm) in letztendlich entsprechende langwellige Formen des Chlide *a* (A680 nm).

Eine Photoreduktion von Pchlide *a* mit einem kurzwelligen Maximum bei A633 nm ist unter den nachfolgend genannten, besonderen Bedingungen, ebenfalls möglich. Erfolgt nach der Isolierung der Fraktion Ü3 eine Lagerung der Proben bei 8 °C über einen Zeitraum von mindestens 8 Tagen und ohne vorherigen Zusatz von NADPH, so ist nach dieser Zeit eine Photoreduktion zunächst nicht mehr möglich. Setzt man jedoch das Cosubstrat nach der Lagerung zu, erfolgt bei Belichtung die Umwandlung von Pchlide *a* zu Chlide *a* mit einem Absorptionsmaximum bei A672 nm (Abb. 53). Die Reaktion benötigt wesentlich höhere Lichtintensitäten und eine längere Belichtungsdauer.

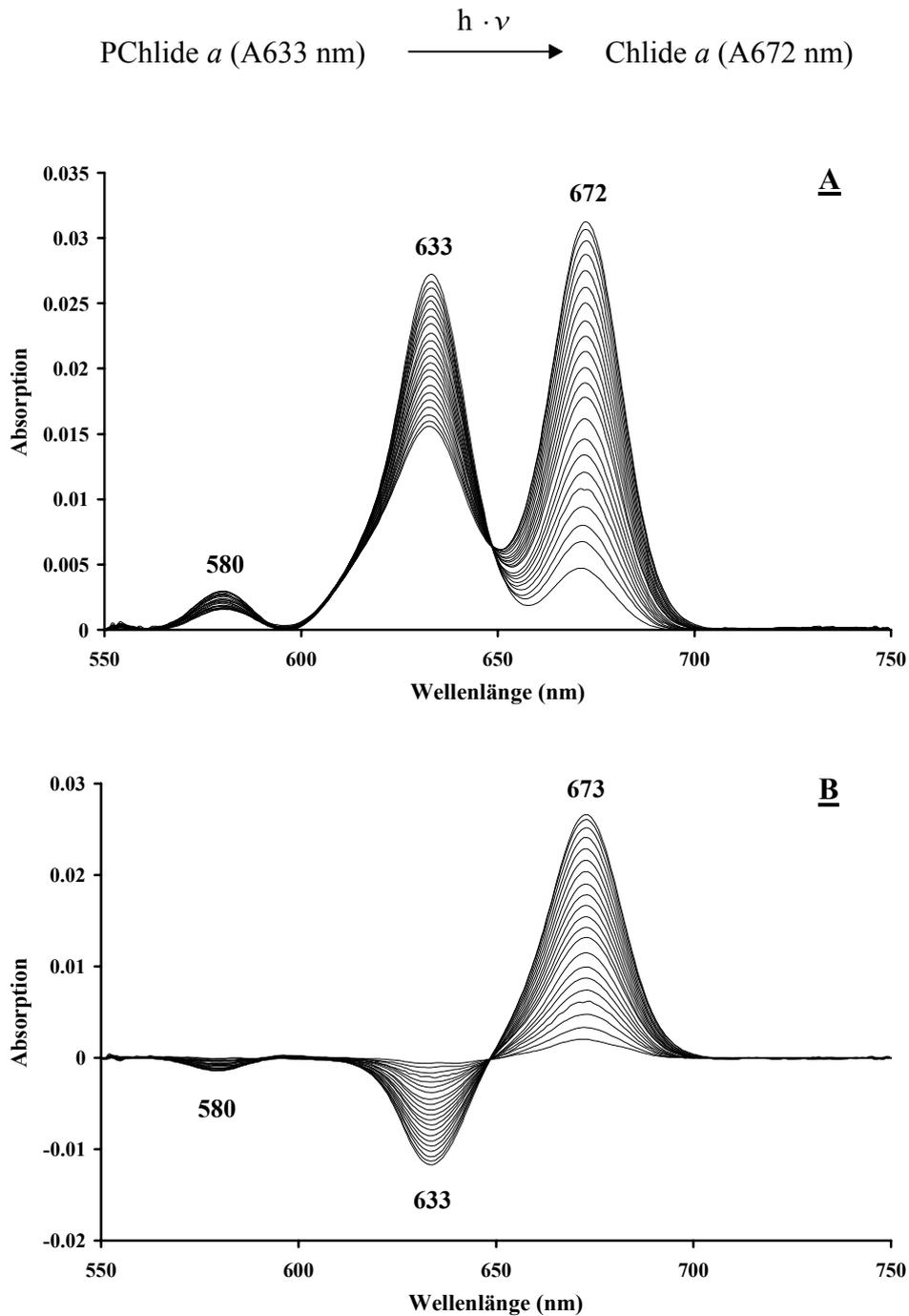


Abb. 53: Die Photoreduktion von Pchl *a* in der Fraktion Ü3 nach Lagerung ohne NADPH.
 A: Die Spektren zeigen den Verlauf der Photoumwandlung von Pchl *a* (1,1 nmol) mit einem Maximum bei A633 nm zu Chl *a* (0,5 nmol) mit einem Maximum bei A672 nm. Die Belichtung erfolgt in 21 Schritten von jeweils 30 s bei einer Lichtintensität von $30\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.
 B: Differenzspektren zu A zwischen den Spektren der Probe nach den jeweiligen Belichtungsschritten zu dem Spektrum der unbelichteten Probe.

Das Auftreten längerwelliger Formen, sowohl für Pchl *a* als auch für Chl *a* wird nicht beobachtet. Dialysiert man eine derart behandelte Probe gegen 80 % Glycerin, geht die Aktivität unwiederruflich verloren.

3.3.3 Die Fraktion „EL“ - Spektrale Verschiebungen unter dem Einfluß von Lipiden

Pigmentfrei eluierte POR zeigt bei Enzymtests in 30 % Glycerinpuffer (siehe Untersuchungen zur Substratspezifität, 3.2.3) nach Zugabe von exogenem Pigment und Belichtung nur die Umwandlung in „kurzwellige“ Produkte. Bei den Edukten treten gleichfalls niemals „langwellige“ Formen auf. Setzt man beispielsweise Zn-Protopheide *a* (3.2.3.1, Abb. 33 G) zu, erfolgt die Umwandlung des Eduktes mit einem Maximum bei A628-630 nm zu Zn-Pheide *a* mit einem Absorptionsmaximum von A667-668 nm. Es gelingt nicht, vor einer Belichtung, durch Dialyse gegen 80 % Glycerinpuffer eine längerwellige Verschiebung des Eduktes zu erzielen. Das Absorptionsmaxima bei A628 nm bleibt unverändert. Zudem geht jegliche Aktivität in einer derart behandelten Probe verloren, wobei diese auch nicht wiederhergestellt wird, wenn in der Folge gegen 30 % Glycerin zurückdialysiert wird.

Es drängt sich daher die Frage auf, worauf dieses gänzlich unterschiedliche Verhalten der pigmentfrei isolierten POR nach der DEAE-Säule gegenüber der solubilisierten POR in der Fraktion Ü3, vor der chromatographischen Reinigung zurückzuführen ist. Einfach ausgedrückt, ist an der Ausbildung der langwelligen Form von Pchlide *a* (A649 nm) ein „Faktor“ beteiligt, der nach der Säulenchromatographie nicht mehr zur Verfügung steht?

In qualitativer Hinsicht bestehen vier wesentliche Unterschiede zwischen diesen beiden Fraktionen. Wie bereits unter Punkt 3.1.1.3 beschrieben, fehlen der pigmentfreien POR in der Fraktion EL neben den begleitenden Proteinen der Fraktion Ü3 der gesamte Anteil der zuvor anwesenden Carotinoide und des endogenen Pchlide *a*. Der Zusatz von isolierten Carotinoiden bewirkt keine längerwellige Verschiebung des Eduktes (Daten nicht gezeigt). Ein vierter, bisher unerwähnter Bestandteil der Fraktion Ü3 gelangt bei der Säulenchromatographie ebenfalls nicht mehr in das Eluat. Es handelt sich hierbei um die Lipide MGDG (Monogalactosyl-diacylglycerol) und DGDG (Digalactosyl-diacylglycerol). Der Nachweis erfolgt nach Extraktion der Lipide in Ethylacetat und Analyse mittels Dünnschichtchromatographie (2.7.3). Um den Einfluß der Lipide auf den Verlauf der Photoreduktion zu untersuchen, werden diese Lipidkomponenten aus Etioplasten in reiner Form isoliert und nach Zusatz von Zn-Protopheide *a* als Pigment-Lipid-Gemische in Enzymtests mit der pigmentfrei isolierten POR eingesetzt. Den Ergebnissen dieser Untersuchungen sind die Resultate der Lipidisolierung und Reinigung vorangestellt.

3.3.3.1 Ergebnisse der Lipidisolierung

Etioplasten ($9,5 \times 10^9$) aus Hafer werden nach der in Punkt 2.2.2 beschriebenen Methode isoliert, und die Lipide extrahiert (2.7.1). Durch stufenweise Elution mit Lösungsmittel steigender Polarität erfolgt die Auftrennung und Reinigung der Lipidklassen über Säulenchromatographie an Kieselgel (2.7.2). Der Erfolg der Trennung wird durch Anfärbung der Lipide nach Dünnschichtchromatographie überprüft (2.7.3).

Die Abbildung 54 zeigt die wesentlichen Fraktionen der Säulenchromatographie. Die Elution der Carotinoide, begleitet von Protopheide *a*, erfolgt in den ersten Schritten mit Dichlormethan (Spur 2) und Dichlormethan/Aceton-Gemischen. Nachdem bei Verwendung von reinem Aceton in der Folge keine Substanzen nachkommen, erfolgt die Elution von zunächst geringen Mengen an sauberen MGDG in der Fraktion mit Aceton/Methanol (4:1). Die Hauptmenge wird bei einem Verhältnis von 3:1 eluiert (Spur 3). Die gesamte Ausbeute liegt bei etwa 16 mg.

Erhöht man in der Folge den Methanol Anteil auf 33 % wird eine Mischung von MGDG und DGDG im Verhältnis von ca. 1:1 erhalten. Diese Fraktion ist jedoch nicht pigmentfrei, sondern besteht zusätzlich aus Pchlide *a*. Dieses sollte aufgrund seiner Polarität bereits mit Dichlormethan eluiert werden, da es jedoch vermutlich noch mit den Lipiden assoziiert ist, läuft es bei der Trennung zusammen mit den Lipiden. Der Identitätsnachweis erfolgt durch eine Kontrolle dieser Fraktion mittels HPLC (durchgeführt von Dr. S. Schoch) mit den Referenzpigmenten Pchlide *a* und [8-Vinyl]-Pchlide *a*. Ungefähr 45 % bis 60 % des in den eingesetzten Etioplasten vorhandenen Pchlide *a* sind hier wiederzufinden. Das Pigment wird von der POR unvermindert akzeptiert und bei Belichtung reduziert. Nach dieser Fraktion wird bei Erhöhung des Methanol Anteils auf 50 % weitgehend sauberes DGDG (Ausbeute ca. 18 mg) eluiert (Spur 5). Weitere, auch nicht identifizierte (Abb. 54, „?“) Komponenten wie in Spur 4, sind selbst bei längerem Spülen mit 100 % Methanol, über DC nicht mehr detektierbar.

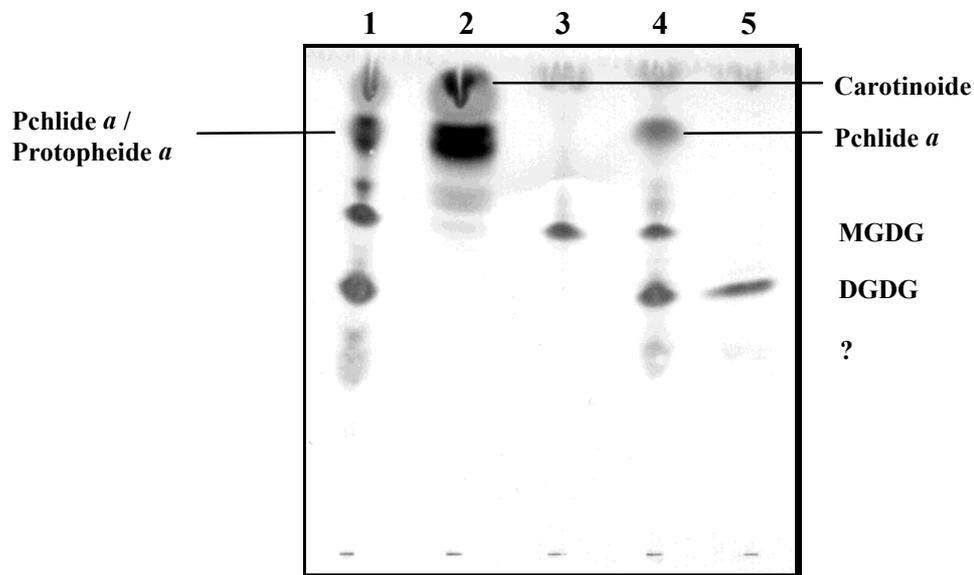


Abb. 54: Lipidgesamtextrakt aus Etioplasten sowie ausgewählte Fraktionen der säulenchromatographischen Auftrennung der Lipidklassen
(1) Gesamtlipidextrakt aus Etioplasten, (2) Dichlormethan Eluat,
(3) bis (5) Aceton/Methanol Eluate mit steigendem Methanol-Anteil.

Für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen zum Einfluß der Lipide auf die Rekonstitution der langwelligen spektralen Verschiebungen der Pigmente werden MGDG-DGDG-Gemische eingesetzt, die zu Zn-Protopheide *a* Lösungen zugesetzt werden (2.7.4.).

Für die Herstellung des Lipidgemisches werden pigmentfreie, weitgehend saubere MGDG- und DGDG-Fractionen (Abb. 55, Spur 1 und 3) verwendet. Die Mischung erfolgt annähernd im Verhältnis 1:1 und wird über DC kontrolliert (Abb. 55, Spur 2).

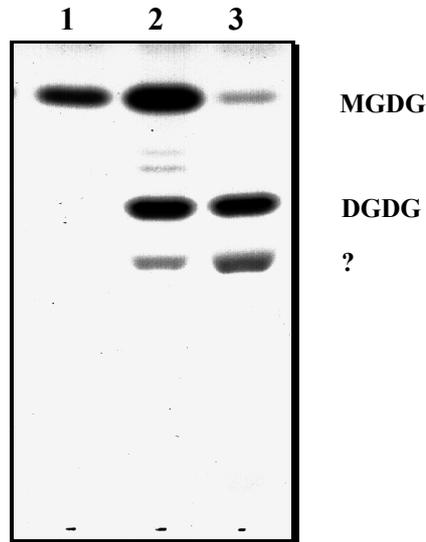
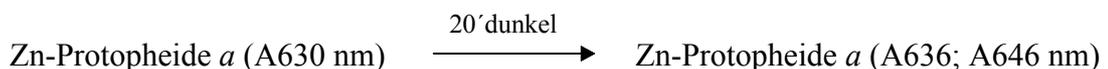


Abb. 55: Weitgehend gereinigte Lipidkomponenten für die Verwendung in enzymatischen Tests

(1) gereinigtes MGDG (2) Mischung der Lipide aus Spur 1 und 3 zur Verwendung in enzymatischen Tests, (3) weitgehend gereinigtes DGDG.

3.3.3.2 Der spektrale Verlauf in 30 % Glycerin nach Lipidzusatz

Die pigmentfreie POR in 30 % Glycerinpuffer wird mit einer Zn-Protopheide *a*-Lipidmischung (2.7.4) versetzt. Zunächst zeigt das direkt im Anschluß aufgenommene Spektrum ein kurzwelliges Absorptionsmaximum bei A630 nm, ähnlich dem Vergleich ohne die Lipidkomponente (Abb. 33 G). Inkubiert man den Ansatz in der Dunkelheit, verschiebt sich das Maximum binnen 20 min langwellig unter Ausbildung einer ausgeprägten Schulter bei A646 nm (Abb. 56 A). Im Differenzspektrum (Abb. 56 B) wird deutlich, daß die Entstehung der Schulter zu Lasten der Absorption bei A627 nm geht. Auch im Soretbereich des Spektrums zeigt sich hier eine Verschiebung von A435 nm auf A451 nm. Ein Vergleich dieses Reaktionsablaufes, insbesondere mit der in Etioplasten (Abb. 44 E) nach der Belichtung, Zusatz von Pchl *a* und Dunkelinkubation auftretenden langwelligen Absorption, weist klare Parallelen auf. Bemerkenswert ist, daß die langwellige Absorption des Eduktes hier bereits in einem Puffer mit 30 % Glycerin und in Gegenwart von 15 mM OG auftritt.



Wird die Probe in der Folge belichtet (Abb. 56 C), weist auch das mehrheitlich aus Zn-Protopheide *a* (A646 nm) entstandene Produkt, gegenüber einem Test ohne die Lipidkomponente, ein um 5 nm langwellig verschobenes Absorptionsmaximum bei A673 nm auf. Die Lage dieses Maximums ändert sich bei nachfolgender Inkubation der belichteten Probe im Dunkeln nicht.

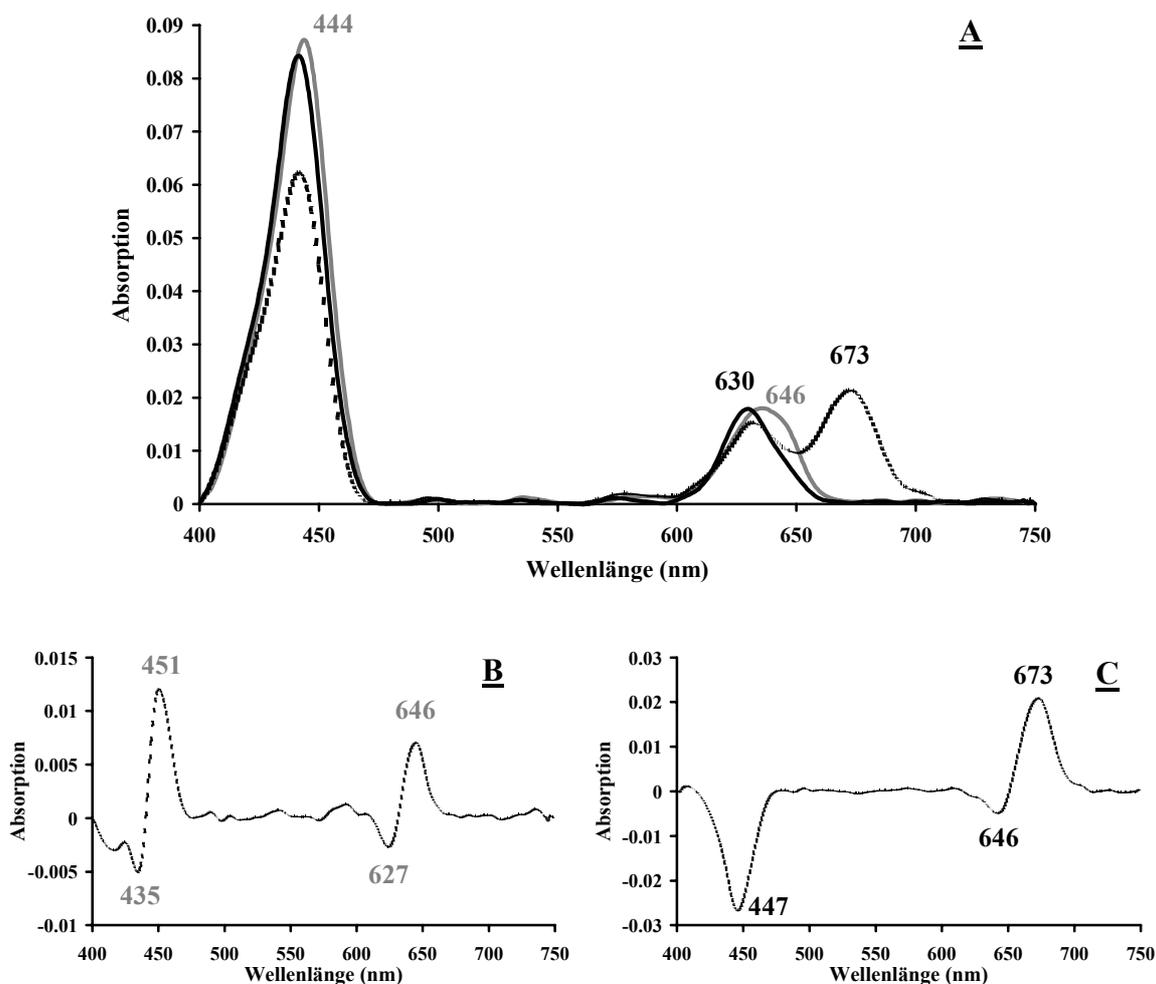
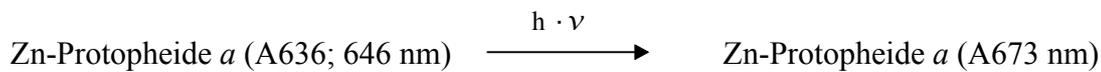


Abb. 56: Die spektrale Verschiebung und die Photoreduktion von Zn-Protopheide *a* in der Fraktion EL (pigmentfrei isolierte POR aus Hafer) unter dem Einfluß von Lipiden in 30 % Glycerinpuffer
A: Die Spektren zeigen die langwellige Verschiebung des Zn-Protopheide *a* Maximums (0,96 nmol) ausgehend von A630 nm (schwarz) zu A636 nm unter Bildung einer Schulter bei A646 nm (grau) durch 20 min Inkubation im Dunkeln. Bei nachfolgender Belichtung mit $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für die Dauer von 40 s bildet sich Zn-Pheide *a* (0,35 nmol) mit einem Maximum bei A673 nm (gestrichelt).
B: Differenzspektrum zu A zwischen dem Spektrum der Probe nach Inkubation im Dunkeln und dem Spektrum der Probe unmittelbar nach Zugabe eines Zn-Protopheide *a*-Lipid-Gemisches.
C: Differenzspektren zu A zwischen dem Spektrum der belichteten Probe (gestrichelt) zu dem Spektrum der unbelichteten Probe nach Inkubation im Dunkeln (grau).

3.3.3.3 Der spektrale Verlauf in 80 % Glycerin nach Lipidzusatz

Wie bereits erwähnt geht die Aktivität einer mit Pigment, aber ohne Lipid versetzten Probe der Fraktion EL irreversibel verloren, wenn diese gegen 80 % Glycerin dialysiert wird. Erfolgt der Zusatz jedoch als Pigment-Lipid-Gemisch, bleibt sie erhalten. Die in 30 % Glycerin bereits angedeutete Ausbildung der langwelligen Absorption verstärkt sich durch die Dialyse merklich (Abb. 57). Das durch die Belichtung entstehende Zn-Pheide *a* zeigt im Vergleich zu der oben beschriebenen nicht dialysierten Probe (Abb. 56 C) eine noch stärkere Verschiebung des Zn-Pheide *a* Maximums in den längerwelligen Bereich. Das Absorptionsmaximum liegt nun bei A678 nm. Die Umwandlung geht fast ausschließlich zu Lasten der Absorption bei A646 nm. Wie aus dem Differenzspektrum hervorgeht, ist der Pigmentanteil mit einem Maximum bei A630 nm in die Reaktion nicht mehr eingebunden.

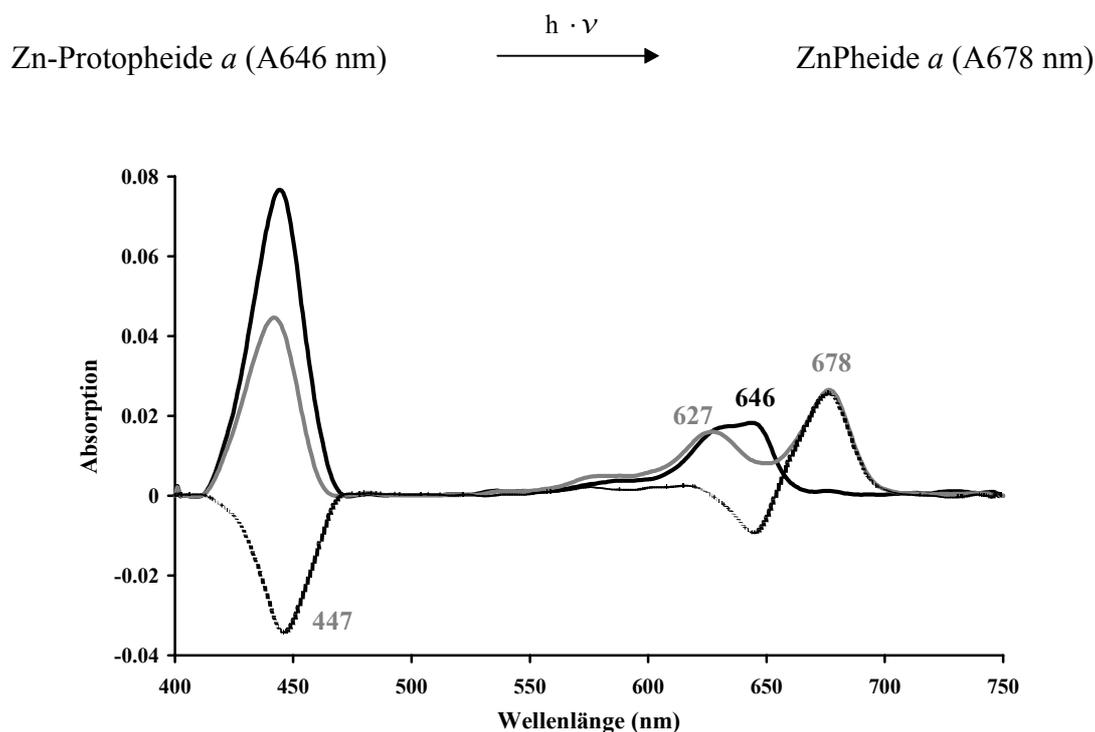


Abb. 57: Die Photoreduktion von Zn-Protopheide *a* in der Fraktion EL unter dem Einfluß von Lipiden in 80 % Glycerinpuffer

Die Spektren zeigen den Verlauf der Photoumwandlung von Zn-Protopheide *a* (0,98 nmol) mit einem Maximum bei A646 nm (schwarz) zu Zn-Pheide *a* (0,44 nmol) mit einem Maximum bei A678 nm (grau). Die Belichtung erfolgt für die Dauer von 120 s bei einer Lichtintensität von $7,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Das gestrichelte Spektrum ist das Differenzspektrum zwischen dem Spektrum der belichteten Probe zu dem Spektrum der unbelichteten Probe.

Vergleichbar mit der Reaktion in der Fraktion Ü3 in 80 % Glycerinpuffer (Abb. 49) verschiebt sich das Maximum des Produktes durch Stehenlassen der Probe im Dunkeln (Abb. 58). Die Verschiebung ist jedoch bereits nach 30 min abgeschlossen, und somit die Geschwindigkeit gegenüber der Verschiebung in der Fraktion Ü3 erhöht. Darüber hinaus besteht ein wesentlicher Unterschied darin, daß die Neubildung des langwelligen Produktes nun hierbei nicht mehr auftritt. Sehr wahrscheinlich ist, daß der verbliebene Pigmentanteil mit einem Maximum bei A627 nm der (*S*)-Konfiguration zuzurechnen ist und somit als Substrat für die POR nicht zur Verfügung steht.

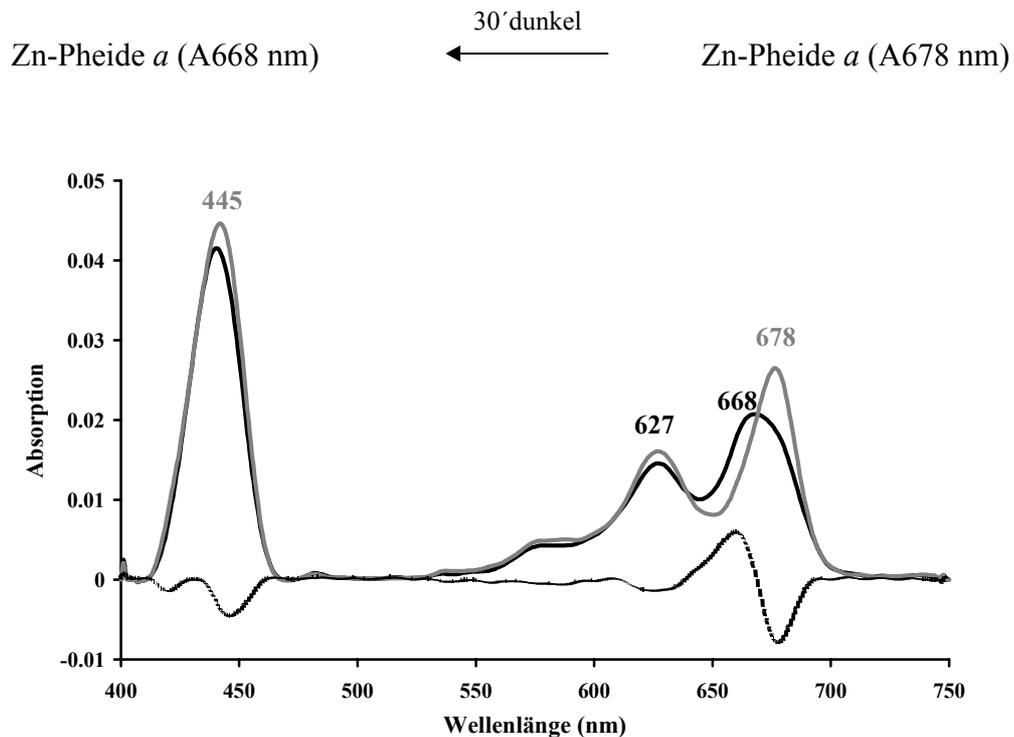


Abb. 58: Die Verschiebung des Absorptionsmaximums von Zn-Pheide *a* durch Inkubation im Dunkeln

Verlauf der Verschiebung des Zn-Pheide *a* Maximums bei A678 nm (grau) zu A668 nm (schwarz) während einer Inkubationszeit der Probe im Dunkeln von 30 min. Das gestrichelte Spektrum zeigt das zugehörige Differenzspektrum.

Setzt man daher nach abgeschlossener Photoreaktion neues Substrat zu, erfolgt, ähnlich wie bereits in Etioplasten (Abb. 44, E) gezeigt, die Neubildung einer langwelligen Absorption bei A646 nm mit einer parallel verlaufenden weiteren Verschiebung des Zn-Pheide *a*-Anteils bei A679 nm auf A668 nm. Die Probe muß hierzu nach Zusatz zunächst wieder im Dunkeln inkubiert werden (40 min). Der Verlauf dieser Neubildung sowie die erneute Umwandlung durch nachfolgende Belichtung sind in den Abbildungen 59, bzw. 60 dargestellt.

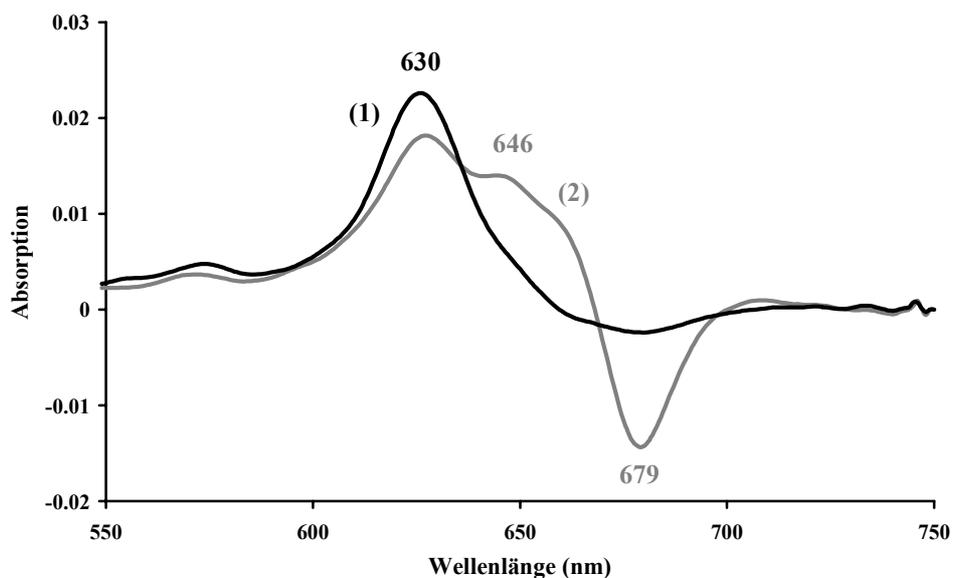


Abb. 59: Die Ausbildung des langwelligeren Absorptionsmaximums von Zn-Protopheide *a* durch Inkubation im Dunkeln sowie die gleichzeitig parallel verlaufende kurzwellige Verschiebung des Zn-Pheide *a* Maximums

Das Spektrum (1) zeigt das Differenzspektrum zwischen dem Spektrum in Abb. 58 (schwarz) und einem Spektrum unmittelbar nach Zugabe von 1,21 nmol Zn-Protopheide *a*.

Das Spektrum (2) zeigt das Differenzspektrum zwischen dem Spektrum in Abb. 58 (grau) und einem Spektrum 40 min nach Zugabe von 1,21 nmol Zn-Protopheide *a*.

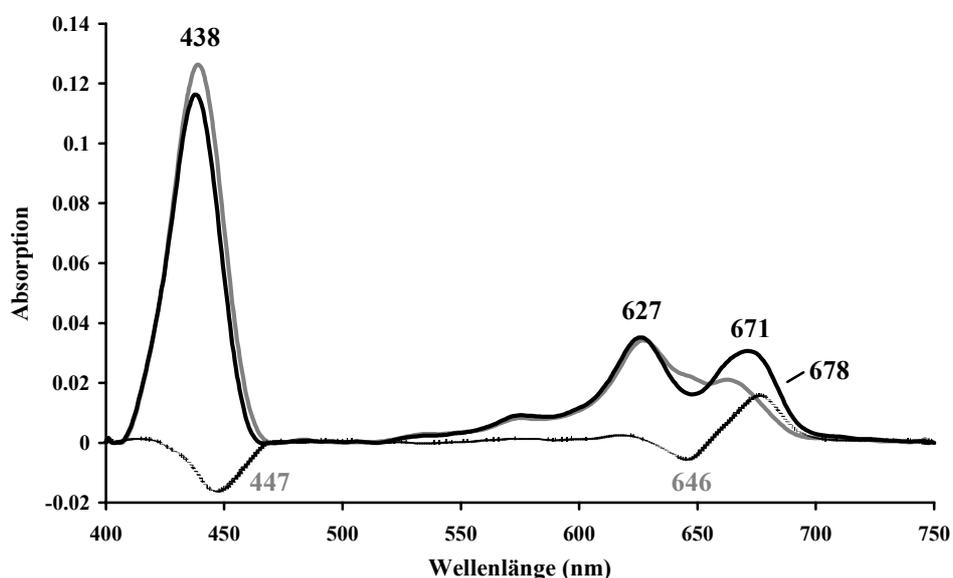


Abb. 60: Die Photoreduktion des durch Inkubation im Dunkeln neu gebildeten langwelligeren Zn-Protopheide *a* (siehe Abb. 59).

Nach der Inkubation der Probe im Dunkeln (graues Spektrum) liegen die Maxima für Zn-Protopheide *a* bei A627 nm und A646 nm. Das Differenzspektrum (gestrichelt) zwischen dem Spektrum der für 120 s bei $7,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ belichteten Probe (schwarz) und dem Spektrum vor der Belichtung macht deutlich, daß nur Zn-Protopheide *a* mit dem langwelligeren Maximum bei A646 nm photokonvertiert wird. Es entsteht Zn-Pheide *a* (0,25 nmol) mit einem Maximum bei A678 nm.

3.3.4 Der Einfluß von Lipiden auf die spektralen Verschiebungen in der Fraktion „MBP-POR“

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß die Rekonstitution des spektralen Verlaufes der Photoreduktion in der Etioplastenfraktion und der Fraktion Ü3 mit der pigmentfrei aufgereinigten POR der Fraktion EL nur durch den Zusatz von Lipiden erfolgreich darzustellen ist. Die Lipide sollten daher bei der Ausbildung der langwelligen Absorption des Substrates der POR eine signifikante Bedeutung haben. Zu vermuten ist, daß die Verschiebung des langwelligen Produktes zu kürzeren Wellenlängen ebenfalls in diesem Zusammenhang zu sehen ist.

Diese Ergebnisse wurden mit der aus Hafer pigmentfrei aufgereinigten POR erzielt. Letztendlich ist die Anwesenheit nicht detektierbarer weiterer Komponenten, die an diesen Verschiebungen beteiligt sein könnten, nicht restlos auszuschließen. Zur weiteren Überprüfung der erzielten Resultate werden, wie im folgenden beschrieben, die Versuche mit einer in *E.coli* überexprimierten MBP-POR (Maltose-Bindeprotein-POR) wiederholt. Diesen Untersuchungen sind jedoch zunächst die Resultate der Überexpression und Aufreinigung der MBP-POR vorangestellt.

3.3.4.1 Ergebnisse der Überexpression und Proteinaufreinigung von MBP-POR in *E.coli*

Allgemeines:

Herr Dr. M. Timko, Universität von Virginia (USA), führte folgende Vorarbeiten durch [persönliche Mitteilung]: Durch Mutation am 3'-Ende des *malE* Gens, welches für das Maltose-Bindeprotein (MBP) kodiert, wurde in einen pMal-Vektor eine TEV-Protease Schnittstelle eingeführt (pTEV-Vektor). In diesen Vektor wurde das *por* Gen aus Erbse so einkloniert, daß bei Überexpression ein Fusionsprotein aus dem Maltose-Bindeprotein und der POR entsteht. Das Vektorplasmid (Abb. 61) wurde abschließend in einen gegen Tetracyclin resistenten *E.coli* Stamm ER 2508 transformiert. Diesen stellte mir Herr Dr. M. Timko freundlicherweise zur Verfügung.

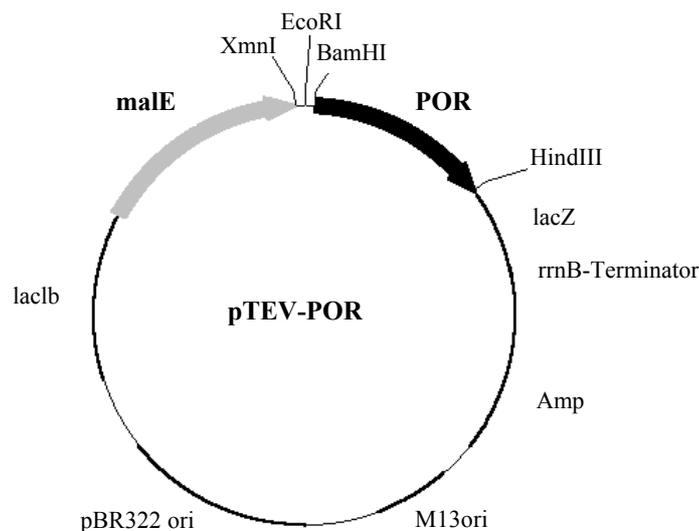


Abb. 61: Schematische Darstellung des MBP-POR Vektorplasmids

Die Anzucht der Bakterien und die Überexpression der MBP-POR, die unter Punkt 2.4 beschrieben sind, erfolgt in 1,2 l LB-Medium. Die Gesamtproteinmenge in den nachfolgend durch Zentrifugation konzentrierten Bakterien liegt in der Regel zwischen 220 mg und 240 mg. Nach dem Aufschluß der Bakterien durch Ultraschallbehandlung und Zentrifugation der Membranen, gelangen durchschnittlich 75 % der Proteinmenge in den Überstand (Abb. 62 A, Spur 1). Die Verteilung der einzelnen Proteine zwischen Überstand und Niederschlag erfolgt weitgehend homogen, das heißt eine selektive Solubilisierung der MBP-POR ist anhand Coomassie gefärbter SDS-Harnstoff-Gele nicht festzustellen. Der Gehalt an MBP-POR im Überstand (Abb. 62, C) kann aufgrund densitometrischer Bestimmungen nach der unter Punkt 2.5.2.4 beschriebenen Methode mit 8 % bis 10 % angegeben werden. Für die Aufreinigung wird der Überstand, nach Verdünnung auf einen Proteingehalt von 3 mg/ml, auf eine Amylose Säule aufgetragen. Im Durchlauf (Abb. 62 A, Spur 2) und im Waschschrift (Abb. 62 A, Spur 3 und 4). werden nahezu alle Proteinverunreinigungen abgetrennt. Die Elution der an das Säulenmaterial gebundenen MBP-POR erfolgt durch Zusatz von 50 mM Maltose. Die Ausbeute beträgt mit 1,2 bis 1,5 mg durchschnittlich 7 % bis 9 % der aufgetragenen MBP-POR-Menge. Die Reinheit der MBP-POR im Eluat liegt bei 90 %. Geringe Mengen von bis zu 5 % freier POR sind ebenfalls enthalten. Die Spaltung des Fusionsproteins erfolgt durch Zugabe von TEV-Protease in einer Konzentration von 0,5 U / 3 µg MBP-POR und Inkubation bei Raumtemperatur für 1 h. Über 90 % des Fusionsproteins sind nach dieser Zeit gespalten (Abb. 62, D). Nur 80 % werden

gespalten, wenn die Inkubation für 3 h auf Eis durchgeführt. Die Aktivität der POR ist im Vergleich zur MBP-POR nicht vermindert.

Im nachfolgenden werden nur die Versuche beschrieben (3.3.4.3 bis 3.3.4.5), bei denen MBP-POR eingesetzt wurde, da sich in allen Vorversuchen zu den gleichen Experimenten mit den Fraktionen 6 und 7 (Abb. 62) keine Unterschiede zu der ungeschnittenen MBP-POR der Fraktion 5 ergeben haben.

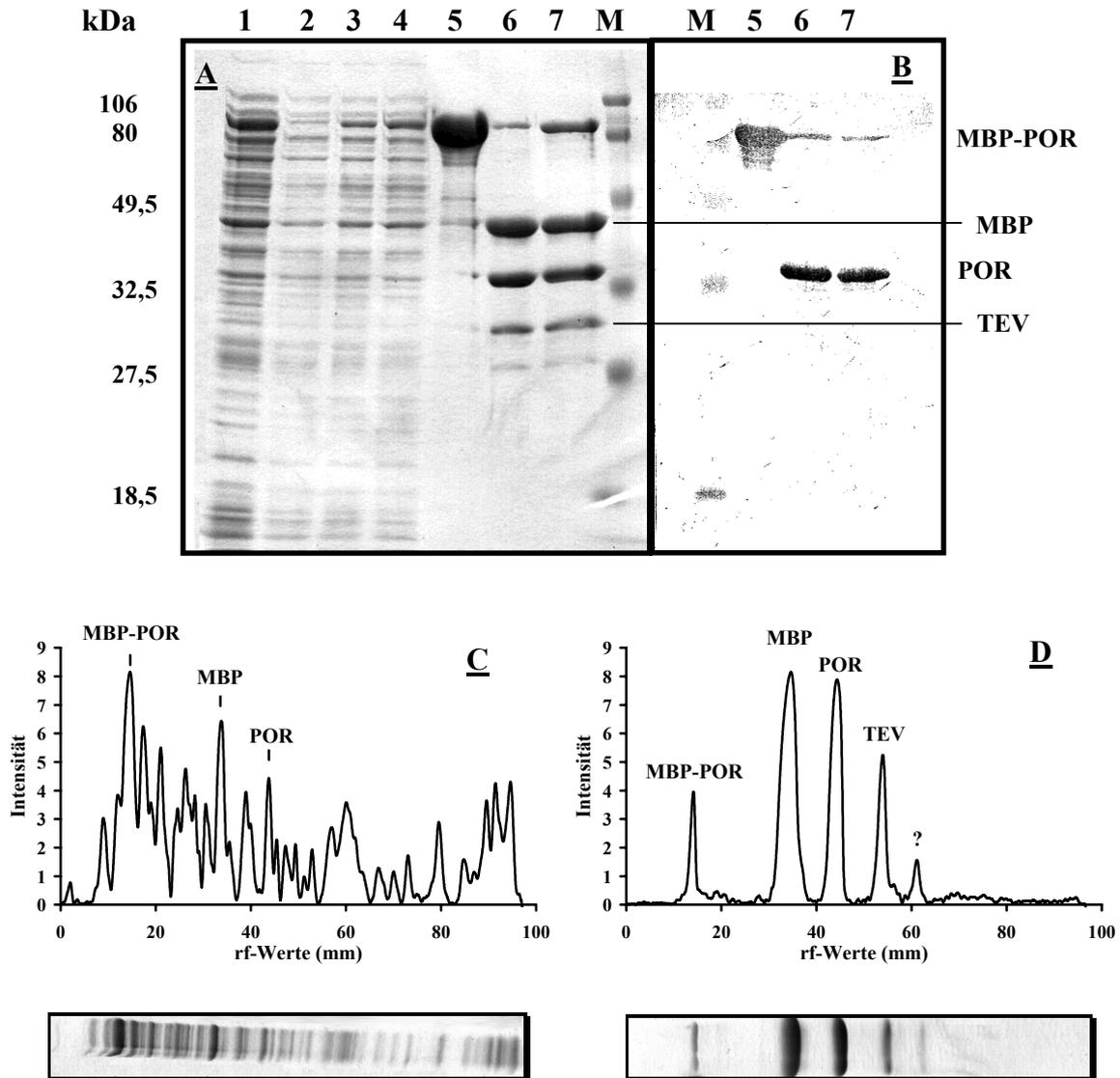


Abb. 62: Verlauf der Aufreinigung der MBP-POR durch Affinitätschromatographie an Amylose sowie die enzymatische Spaltung des Fusionsproteins

- A: SDS-Harnstoff-Gel (Coomassie gefärbt) mit folgenden Fraktionen: Überstand vor dem Auftrag auf die Amylose Säule (1), Durchlauf (2), Waschfraktionen (3 und 4), Eluat (5), Eluat nach Zusatz von TEV-Protease und Inkubation für 1 h bei RT (6), bzw. 3 h auf Eis (7), „Prestained-Marker“ (8).
 B: „Western-Blot“ mit Antikörperfärbung gegen POR, die Nummerierung der Spuren entspricht der Abb. A.
 C: Densitometrische Analyse der Spur 1 (Abb. A).
 D: Densitometrische Analyse der Spur 6 (Abb. A).

3.3.4.2 Der spektrale Verlauf in 30 % Glycerin ohne Lipidzusatz

Ein typisches Spektrum der Photoreduktion, hier von Zn-Protopheide *a*, durch die MBP-POR in 30 % Glycerin und ohne Lipidzusatz ist in Abbildung 63 wiedergegeben.

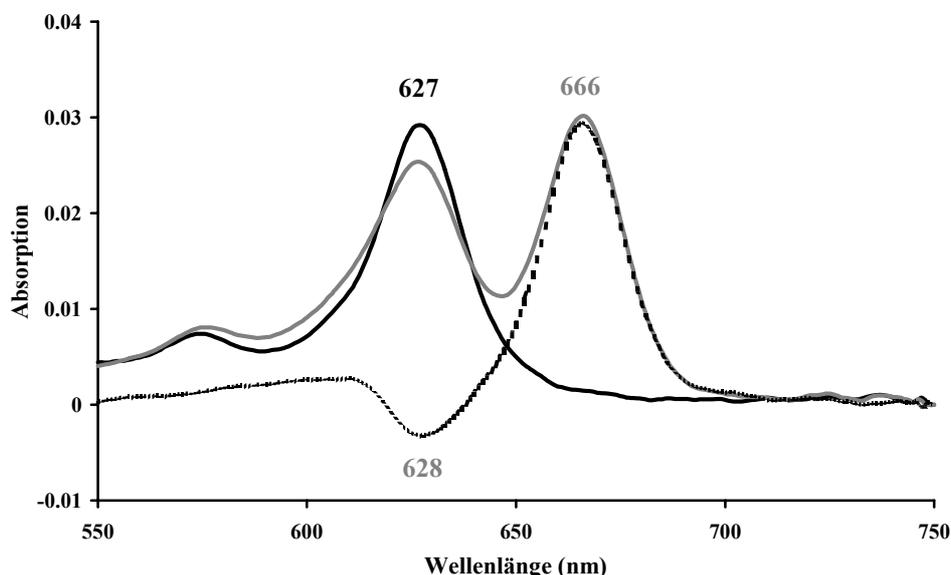


Abb. 63: Die Photoreduktion von Zn-Protopheide *a* in der Fraktion MBP-POR in 30 % Glycerinpuffer.

Die Spektren zeigen den Verlauf der Photoumwandlung von Zn-Protopheide *a* (1,56 nmol) mit einem Maximum bei λ_{627} nm (schwarz) zu Zn-Pheide *a* (0,52 nmol) mit einem Maximum bei λ_{666} nm (grau). Die Belichtung erfolgt für die Dauer von 240 s bei einer Lichtintensität von $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Das gestrichelte Spektrum ist das Differenzspektrum zwischen dem Spektrum der belichteten Probe zu dem Spektrum der unbelichteten Probe.

3.3.4.3 Der spektrale Verlauf in 30 % Glycerin nach Lipidzusatz

Im Vergleich zu einem Enzymtest ohne Lipidzusatz (Abb. 63) ist die Wellenlänge für das Edukt hier (Abb. 64) um 3 nm, bzw. für den im Differenzspektrum erkennbaren photoreduzierbaren Anteil um 6 nm längerwellig verschoben. Die Wellenlängen des jeweils gebildeten Produktes zeigen nur einen geringfügigen Unterschied von 2 nm.

Ein Vergleich des spektralen Verlaufes der Photoreduktion (Abb. 64) mit der Fraktion EL (Abb. 56 A) zeigt, daß in einem 30 % Glycerinpuffer, auch nach 40 min Inkubationszeit des Enzymtestansatzes mit dem Pigment-Lipid-Gemisch, die Verschiebung des Zn-Protopheide *a* Maximums in keiner Weise so deutlich ausfällt, wie unter Verwendung der Fraktion EL. Erst nach Belichtung der Probe wird im Differenzspektrum zur unbelichteten Probe deutlich, daß insbesondere ein Pigmentanteil mit einem Absorptionsmaximum von λ_{634} nm umgewandelt wird. Eine kurzwellige Verschiebung nach der Belichtung durch Inkubation des Ansatzes im Dunkeln ist nicht mehr zu beobachten.

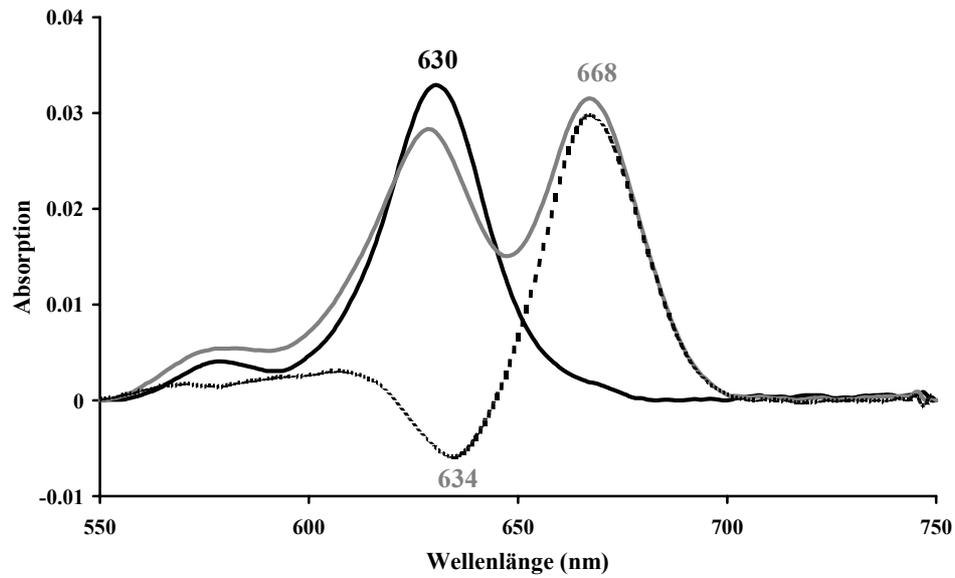


Abb. 64: Die Photoreduktion von Zn-Protopheide *a* in der Fraktion MBP-POR unter dem Einfluß von Lipiden in 30 % Glycerinpuffer

Die Spektren zeigen den Verlauf der Photoumwandlung von Zn-Protopheide *a* (1,76 nmol) mit einem Maximum bei λ_{630} nm (schwarz) zu Zn-Pheide *a* (0,52 nmol) mit einem Maximum bei λ_{668} nm (grau). Die Belichtung erfolgt für die Dauer von 360 s bei einer Lichtintensität von $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Das gestrichelte Spektrum ist das Differenzspektrum zwischen dem Spektrum der belichteten Probe zu dem Spektrum der unbelichteten Probe.

3.3.4.4 Der spektrale Verlauf in 80 % Glycerin nach Lipidzusatz

Nach Dialyse gegen 80 % Glycerin geht die Umwandlung merklich von einem längerwelligen Edukt aus. Im Differenzspektrum nach Belichtung (Abb. 65) liegt das negative Maximum für das Edukt nun bei A639 nm. Im Vergleich mit dem Enzymtest in 30 % Glycerinpuffer fällt auf, daß der Umsatz zunächst wesentlich geringer ausfällt.

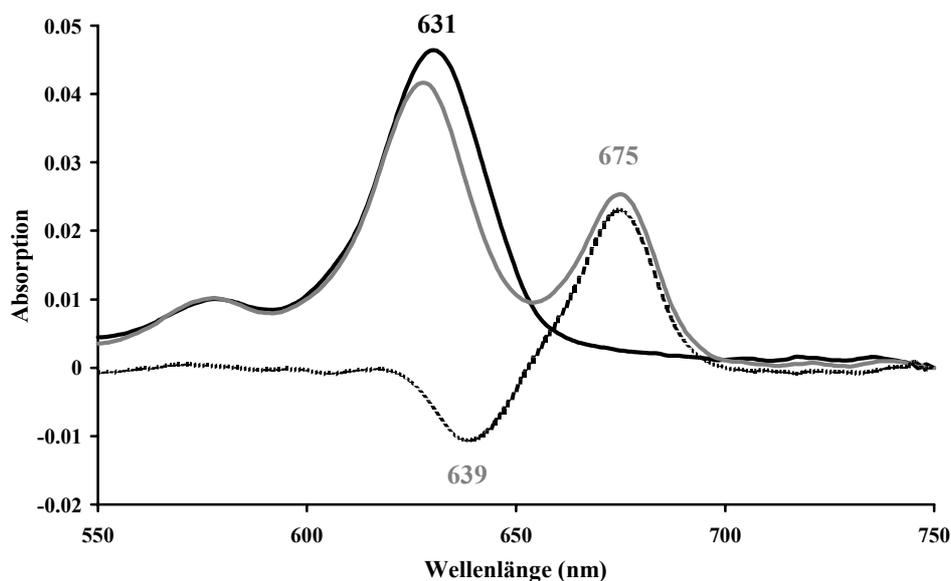


Abb. 65: Die Photoreduktion von Zn-Protopheide *a* in der Fraktion MBP-POR unter dem Einfluß von Lipiden in 80 % Glycerinpuffer.

Die Spektren zeigen den Verlauf der Photoumwandlung von Zn-Protopheide *a* (2,48 nmol) mit einem Maximum bei A630 nm (schwarz) zu Zn-Pheide *a* (0,41 nmol) mit einem Maximum bei A675 nm (grau). Die Belichtung erfolgt für die Dauer von 60 s bei einer Lichtintensität von $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Das gestrichelte Spektrum ist das Differenzspektrum zwischen dem Spektrum der belichteten Probe zu dem Spektrum der unbelichteten Probe.

Das gebildete Produkt liegt bei A675 nm und verschiebt sich durch Inkubation der Probe im Dunkeln sehr schnell auf A664 nm (A679 nm \rightarrow A660 nm im Differenzspektrum, Abb. 66 B). Dabei erfolgt, wenn auch nur geringfügig, eine Neubildung von Zn-Protopheide *a* mit einer Schulter bei A639 nm aus kürzerwelligen Anteilen des Eduktes.

Ein zweite Belichtung der Probe im Anschluß an diese Dunkelperiode (Abb. 66 C) bewirkt die erneute Bildung von Zn-Pheide *a*. Über 50 % des bei der ersten Belichtung entstehenden Produktes (Abb. 65) werden so nochmals neu gebildet.

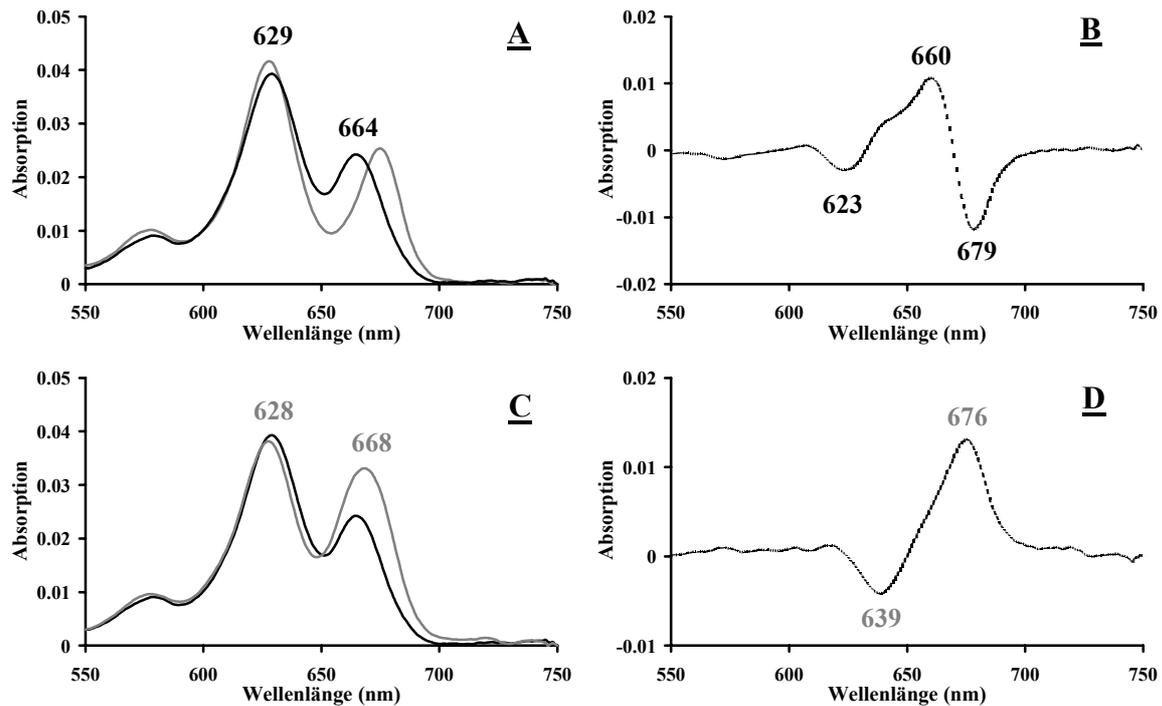


Abb. 66: Die Ausbildung des langwelligen Absorptionsmaximums von Zn-Protopheide *a* durch Inkubation im Dunkeln während der gleichzeitig parallel verlaufende kurzwellige Verschiebung des Zn-Pheide *a* Maximums sowie die erneute Photoreduktion.

- A: Verlauf der Verschiebung des Zn-Pheide *a* Maximums bei A675 nm (grau, siehe auch Abb. 65) zu A664 nm (schwarz) während einer Inkubationszeit der Probe im Dunkeln von 40 min.
- B: Das gestrichelte Spektrum zeigt das zu A zugehörige Differenzspektrum mit der Ausbildung eines geringfügigen Maximums von Zn-Protopheide *a* bei A639 nm zu Lasten der Absorption bei A623 nm.
- C: Die Photoreduktion des neu gebildeten photoaktiven Zn-Protopheide *a* bei A639 nm (schwarz) zu Zn-Pheide *a* (0,21 nmol grau) durch eine Belichtung für die Dauer von 30 s bei $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.
- D: Differenzspektrum zu C zwischen dem Spektrum nach Belichtung mit dem Spektrum vor Belichtung.

Beläßt man die Probe nachfolgend für längere Zeit im Dunkeln (8 Tage, 8 °C) bildet sich neben einer erneuten kurzwelligen Verschiebung des Produkts ebenfalls ein nun sehr deutlich erkennbares Absorptionsmaximum für Zn-Protopheide *a* bei A644 nm (Abb. 67) aus. Nach der folgenden Belichtung zeigt ein Vergleich mit der Probe in 30 % Glycerin, daß in der Summe in 80 % Glycerin insgesamt mehr Produkt entstanden ist, dieses jedoch nicht durch eine Belichtung sondern insgesamt während drei Belichtungen mit Unterbrechungen durch unterschiedlich lange Dunkelperioden.

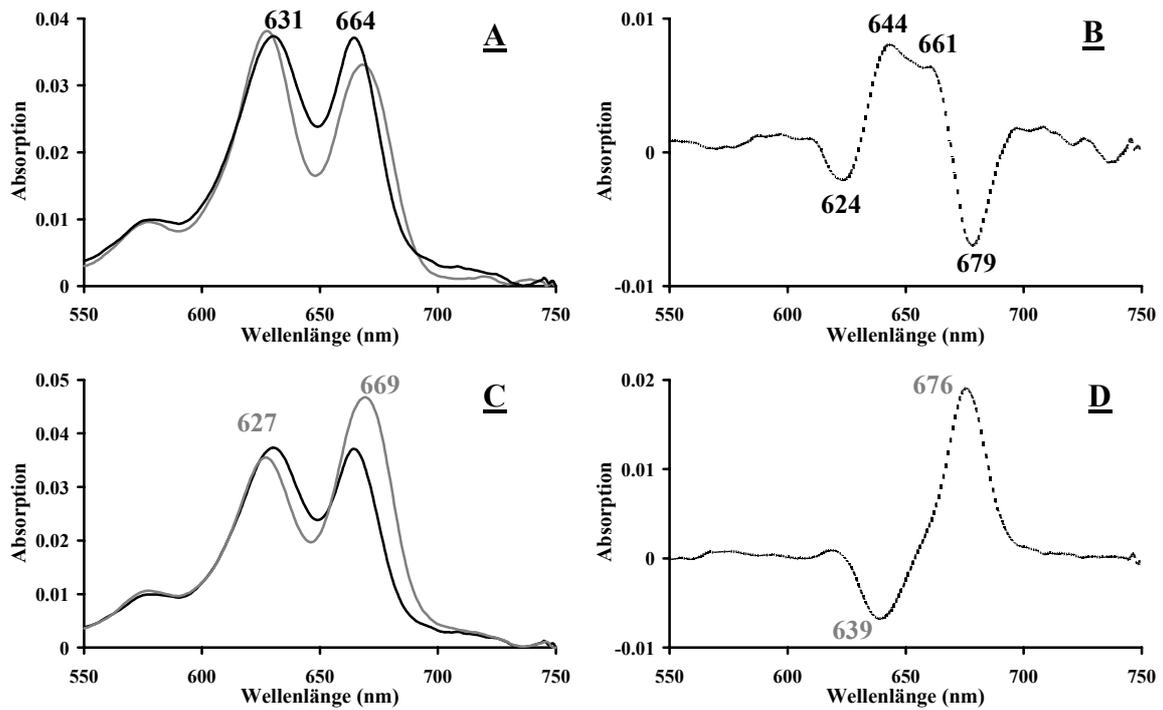


Abb. 67: Die erneute Ausbildung und Photoreduktion des langwelligen Absorptionsmaximums von Zn-Protopheide *a* durch 8 Tage Inkubation im Dunkeln sowie die kurzwellige Verschiebung des Zn-Pheide *a* Maximums

- A: Verlauf der Verschiebung des Zn-Pheide *a* Maximums bei A668 nm (grau) zu A664 nm (schwarz) während einer Inkubationszeit der Probe im Dunkeln von 8 Tagen.
- B: Das gestrichelte Spektrum zeigt das zu A zugehörige Differenzspektrum mit der Ausbildung eines deutlichen Maximums von Zn-Protopheide *a* bei A644 nm zu Lasten der Absorption bei A624 nm.
- C: Die Photoreduktion des neu gebildeten photoaktiven Zn-Protopheide *a* (schwarz) zu Zn-Pheide *a* (0,31 nmol grau) durch eine Belichtung für die Dauer von 30 s bei $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.
- D: Differenzspektrum zu C zwischen dem Spektrum nach Belichtung mit dem Spektrum vor Belichtung.

3.3.4.5 Verhalten von MBP-POR gegenüber Pigmentaggregaten

Pchl *a*-Aggregate in 30 % Glycerinpuffer zeigen Absorptionsmaxima bei 472 nm und 649 nm. Durch Zusatz von > 25 mM OG können sie in Monomere überführt werden. Setzt man POR zu, ist der gleiche Effekt zu beobachten.

In Abbildung 68 ist dieser Vorgang anhand des Zusatzes von in *E.coli* überexprimierter MBP-POR sowie die nachfolgende Photoreduktion der entstandenen Monomere durch Belichtung dargestellt.

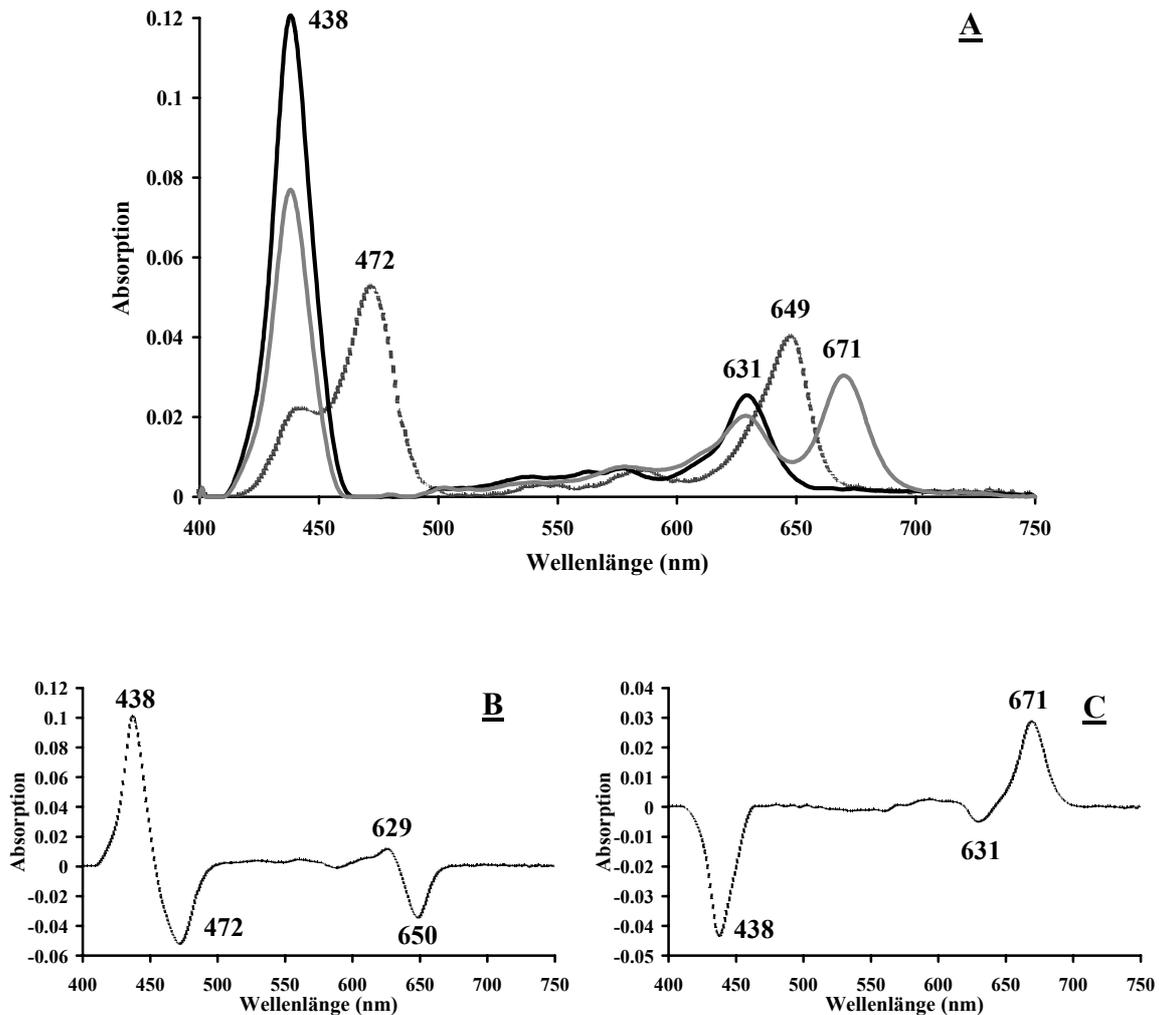


Abb. 68: Rückführung von Pigmentaggregaten zu Monomeren durch Zusatz von MBP-POR und nachfolgende Photoreduktion der Monomere

- A: Pchl *a*-Aggregate (1,1 nmol) in 30 % Glycerinpuffer mit Maxima bei 472 nm und 649 nm (gestrichelt), Pchl *a* Monomere mit den Maxima bei 438 nm und 631 nm (schwarz) nach Zusatz von 2 nmol MBP-POR und Photoreduktion der Monomere zu Chlide *a* (A671 nm) durch nachfolgende Belichtung für 180 s bei $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (grau).
- B: Differenzspektrum nach Zusatz von POR (A: gestricheltes Spektrum - schwarzes Spektrum)
- C: Differenzspektrum nach Belichtung (A: graues Spektrum - schwarzes Spektrum)

3.3.5 Diskussion

Ein Schwerpunkt der Forschung zu dem Thema POR liegt seit Ende der 50`er Jahre in der Untersuchung der *in vivo* auftretenden unterschiedlichen spektralen Formen und Verschiebungen des Substrates Pchl a , respektive des Produktes der Photoumwandlung Chl a [Übersichtsartikel: Rüdiger & Schoch 1988, Griffiths 1991]. Zunächst anhand von *in vivo* Untersuchungen, später auch mittels zahlreicher *in vitro* Experimente, wurde versucht deren molekulare Ursachen aufzuklären. Trotz vieler Fortschritte besteht hierzu bis heute keine endgültige Klarheit. Im folgenden werden zunächst Modelle vorgestellt, die von den meisten Autoren akzeptiert wurden. Anschließend werden kontroverse Meinungen diskutiert und mit eigenen Daten verglichen.

Oliver & Griffiths [1982] fassen den Reaktionsablauf wie folgt zusammen (Abb. 69):

Photokonvertierbares Pchl a liegt *in vivo* in zwei spektralen Formen mit Absorptionsmaxima bei 638 nm und 650 nm vor. Allgemein anerkannt ist, daß die funktionelle Einheit beider photoaktiver Formen aus einem ternären Komplex besteht, an dem neben dem Pigmentanteil die POR und auch NADPH als Coenzym beteiligt sind [Griffiths 1978]. Das erste, unter Belichtung mit sättigenden Lichtintensitäten entstehende stabile Produkt, zeigt ein Absorptionsmaximum bei 678 nm [Gassman *et al.* 1968]. Es verschiebt sich binnen weniger Sekunden langwellig auf 684 nm [Griffiths 1975]. Während eines Zeitraums von mindestens 10 min folgt eine weitere Verschiebung von 684 nm auf 672 nm [Shibata 1957]. Sie wird als „Shibata-Shift“ bezeichnet. Die schnelle Verschiebung von 678 nm auf 684 nm wird durch den Austausch des oxidierten NADP⁺ mit seinem reduzierten Antagonisten erklärt. Die Ursache der darauf folgenden langsamen Verschiebung von 684 nm auf 672 nm wird in der Loslösung des Chl a von dem ternären Komplex gesehen. Dieser ist dann in der Lage nicht enzymgebundenes, „freies“ Pchl a 630 nm [Dujardin & Sironval 1970] aufzunehmen und erneut photoaktive Komplexe mit Maxima bei 638/650 nm zu bilden [Murray & Klein 1971, Brodersen 1976].

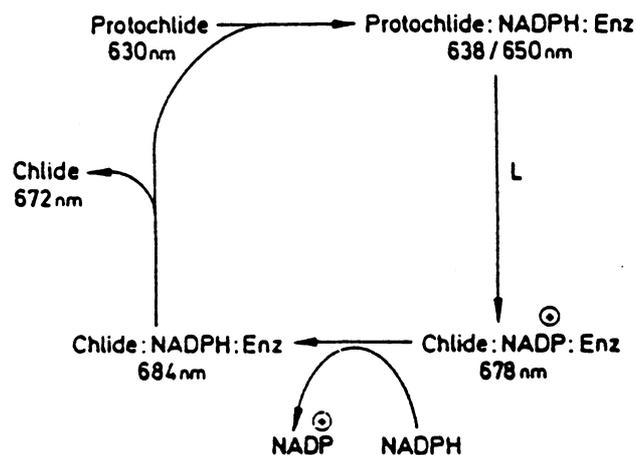


Abb. 69: Modell nach Oliver & Griffiths [1982] zu dem Spektralen Verlauf der Photoreduktion von Pchl a *in vivo*.

Wenngleich dieses Modell auf die molekularen Ursachen der meisten Spektralverschiebungen hinweist, so bietet es doch keine Erklärung für die unterschiedlichen spektralen Formen des photokonvertierbaren Pchl a (A638 nm und A650 nm).

3.3.5.1 Modellvorstellungen zu den molekularen Ursachen der Pchlide *a* Formen

Lebedev & Timko [1999] sehen die POR (hier PORB) in den ternären Komplexen mit der Absorption bei A638 nm als Monomer. Böddi *et al.* [1991] nehmen jedoch an, daß die Pchlide *a* Formen A638 nm und A650 nm durch unterschiedlich stark aggregierte ternäre Komplexe zustande kommen und ordnen die Form A638 nm dabei geringer aggregierten Komplexen zu. Chahdi *et al.* [1998] vermuten, daß die Untereinheiten dieser Aggregate aus POR-Dimeren aufgebaut sind. Auch Martin *et al.* [1997] sehen Hinweise, daß die POR stabile Dimere bilden kann.

Die Abbildung 70 stellt schematisch die in der weiteren Diskussion verwendeten Modelle für freies, nicht enzymgebundenes Pchlide *a* (A628-A630 nm) und ternäre Komplexe aus Pchlide *a*, NADPH und POR vor. Dabei ist eine Membranassoziation dieser Komplexe berücksichtigt. Die ternären Komplexe werden hier ohne eigene Beweisführung durchgehend als Dimere dargestellt. Die grundlegenden Überlegungen würden aber genauso gelten, wenn der ternäre Komplex als Monomer vorliegen würde.

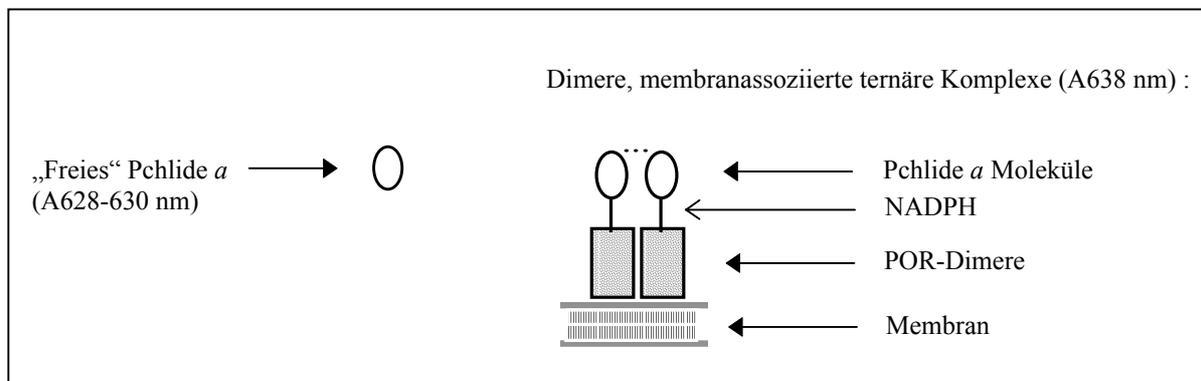


Abb. 70: Schematisches Modell für „freies“ Pchlid *a* (A628-630 nm) und für die Anordnung der Pchlid *a* Moleküle (A638 nm) in dimeren, ternären Komplexen.

Die langwellige, photokonvertierbare Form von Pchlid *a* mit einem Absorptionsmaximum bei A650 nm wird durch die Wechselwirkung zwischen räumlich sehr eng zusammenstehenden Pigmentmolekülen in hochaggregierten ternären Komplexen erklärt [Böddi *et al.* 1989].

Festzuhalten ist, daß weder die Größe der Aggregate, also die Anzahl der Pchlid *a* Moleküle, noch das Verhältnis der Pchlid *a* / NADPH / POR Moleküle zueinander genau bekannt sind. Sironval & Kuyper [1972] kalkulieren auf Basis von Energieübertragungsversuchen 18 Pchlid *a* Moleküle für A650 nm und, wie bereits angesprochen, vermuten Apel *et al.* [1980] die Bindung von 2 bis 3 Molekülen Pchlid *a* an ein Molekül POR. In Punkt 3.1.2.2.3 konnte gezeigt werden, daß nur ein Molekül Pchlid *a* an das Enzym gebunden ist. Eine Pigmentaggregation als Ursache der spektralen Form A650 nm setzt daher voraus, daß die Pchlid *a* Moleküle entweder durch die Aggregation der Proteine oder durch andere Umstände so eng zusammenkommen, daß Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Pigmentmolekülen ermöglicht werden. Schon früh wurde dabei vermutet [Klein & Schiff 1972], daß hierbei die molekulare Umgebung *in vivo* eine Rolle spielen könnte.

Die ternären Komplexe mit einem Absorptionsmaximum bei 650 nm sind in die Prolamellarkörper (PLB's) eingebettet [Ryberg & Dehesh 1986]. Die Besonderheit dieses Membransystems erklärt sich aus dessen kompakter, parakristallinen Struktur. In einem Übersichtsartikel stellen Selstam & Widell-Wigge [1993] ein Modell auf, wonach dieses System aus zwei unabhängigen, miteinander verwobenen Wasserkanälen aufgebaut ist, die durch eine Doppelmembran voneinander getrennt sind (Abb. 71).

Die inneren Wasserkanäle treffen sich dabei an 4-armigen Verzweigungspunkten, an denen die Membranen zusammentreffen. Williams *et al.* [1998] konnten später nachweisen, daß die PLB's tatsächlich eine 4-armige Struktur zeigen und die POR hier asymmetrisch verteilt ist.

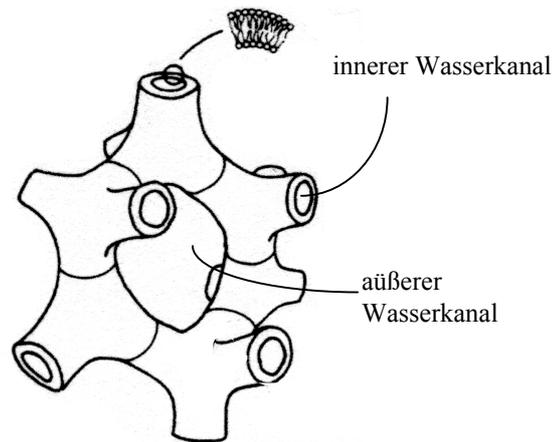


Abb. 71: Modell zur bikontinuierlichen 4-armigen kubischen Struktur in PLB's [Selstam & Widell-Wigge 1993].

Der Vorteil dieses Membransystems liegt insbesondere darin, daß die Oberfläche stark vergrößert ist und somit eine Art Großraumspeicher mit dennoch geringstem Platzbedarf besteht. Aufgrund der sehr hohen Dichte in den inneren Wasserkanälen wäre es vorstellbar, daß die Komplexe in diesen Bereichen sehr eng gepackt vorliegen. Die an POR gebundenen Pigmentmoleküle könnten so auch ohne Aggregation von Enzym-Dimeren miteinander in Wechselwirkung treten. Eine mögliche Anordnung ist schematisch in der Abbildung 72 wiedergegeben.

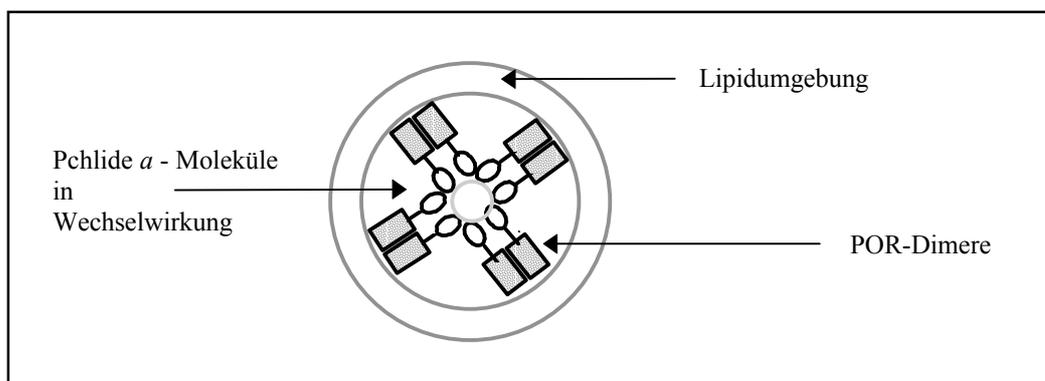


Abb. 72 : Schematisches Modell zur Anordnung der Pchlid a - Moleküle (A650 nm) in Bereichen der Prolamellar Körper, die eine hohe Dichte aufweisen (innerer Wasserkanal).

Folgt man dieser Hypothese, ist die Absorption des kürzerwelligen, photoaktiven Pchlids *a* bei 638 nm nicht durch eine Aggregation, sondern durch eine Lokalisation der Dimeren außerhalb der Bereiche mit sehr hoher Dichte erklärbar (äußere Wasserkanäle).

Ziel der im folgenden diskutierten Versuche war es, *in vitro* alle *in vivo* auftretenden spektralen Formen an solubilisierter POR darzustellen und insbesondere die langwellig-absorbierenden Formen aus kurzwellig-absorbierenden Formen zu rekonstituieren.

3.3.5.2 Spektrale Formen in solubilisierten Etioplasten

Photoaktives Pchlid *a* mit einem Maximum bei 650 nm und der Shibata-Shift konnten bis heute *in vitro* nur erhalten werden, wenn die Struktur der PLB's bei der Isolierung weitgehend intakt blieb [Böddi *et al.* 1990]. Waren in teilweise solubilisierten Etioplasten zumindest noch PLB-Fragmente [Chahdi *et al.* 1998] vorhanden, konnten Komplexe (650 nm) mit einem Molekulargewicht von ungefähr 1000 kDa zusammen mit Carotinoiden und weiteren Membrankomponenten isoliert werden.

Zunächst wurden die Auswirkungen der Solubilisierung auf die spektralen Formen in der Etioplastenfraktion untersucht. Da später auch andere Fraktionen der Aufreinigung, speziell die Fraktion Ü3 mit der angereicherten POR, sowie letztendlich auch die pigmentfrei zur Homogenität gereinigte POR in der Fraktion EL, in diese Untersuchungen einbezogen werden sollten, wurde der Puffer für die Versuche an Etioplasten dem bei der Aufreinigung verwendeten Puffer (u.a. 30% Glycerin, 15 mM OG, 1 mM NADPH) angepaßt.

Die Abbildung 40, A zeigt für das photokonvertierbare Pchlid *a* ein Absorptionsmaximum bei 643 nm. Dies stimmt mit den Resultaten von Wiktorsson *et al.* [1992] überein, die in weitgehend aufgereinigten und mit 10 mM OG solubilisierten PLB-Fractionen ein Maximum bei 641 nm beobachten. Nach der Photoumwandlung sehen die Autoren das Maximum des gebildeten Chlids *a* jedoch bei 676 nm, während das hier gebildete Chlid *a* ein Maximum von 680 nm zeigt (Abb. 40 A). Ein kurzwellig bei 631 nm absorbierender Teil des Pchlids *a* ist, ebenso wie bei Wiktorsson *et al.* nicht photokonvertierbar.

Böddi *et al.* [1990] vermuten, daß der Aggregationszustand der Pigmente auch nach der Belichtung weitgehend erhalten bleibt und somit Chlid *a* 672 nm aus Pchlid *a* 638 nm und Chlid *a* 684 nm aus Pchlid *a* 650 nm entsteht. Sind die langwelligen Formen des Pchlids *a* bei 650 nm, sowie des Chlids *a* bei 678-684 nm *in vivo* tatsächlich auf eine Protein- und Pigmentaggregation zurückzuführen, wäre zu erwarten gewesen, daß hier aus den weniger aggregierten Pchlid-POR-Komplexen (643 nm) bei der Photoumwandlung entsprechend gering aggregierte Chlid-POR-Komplexe entstehen (672 nm). Dies ist jedoch nicht der Fall, da das entstandene Chlid *a* deutlich im langwelligeren Bereich bei 680 nm absorbiert.

Den Shibata-Shift erklären die gleichen Autoren mit der Disaggregation der Komplexe zu weniger stark aggregierten Formen, wobei Wiktorsson *et al.* [1996] diesen Vorgang zudem in Zusammenhang mit einer Dephosphorylierung der ternären Enzym-Produkt-Komplexe sehen. Der Shibata-Shift findet hier statt, er ist jedoch sehr stark verlangsamt und dauert bis zum vollständigen Erreichen des Maximums bei 672 nm bis zu 180 min (Abb. 41 A). Eine zeitlich verzögerte Verschiebung wurde von Brodersen [1976] *in vitro* sowie von

Stobart & Ameen-Bukhari [1986] *in vivo* beobachtet und auf einen hemmenden Einfluß des Glycerins zurückgeführt.

Der Verlauf (Abb. 41 A) zeigt bis etwa 676 nm eine sinkende Absorption, um danach bis zum Erreichen von 672 nm wieder anzusteigen. *In vivo* wurde ein identischer Ablauf beobachtet [Virgin & French 1973] und der zeitlich sigmoiden Verlauf mit Änderungen im Protein und nicht mit einer Disaggregation von aggregierten Chlide *a* Molekülen begründet.

Eullaffroy *et al.* [1995] hingegen schließen eine Disaggregation von hoch aggregierten POR-Chlide-Komplexen zu weniger stark aggregierten Komplexen nicht aus. Dennoch gehen die Autoren davon aus, daß *in vivo* am Ende der Shibata-Shift ein Teil des Chlide *a* nicht mehr an die POR assoziiert sein kann.

Durch Infiltration mit ALA können im Dunkeln gewachsene Primärblätter, je nach Inkubationsdauer, ein Vielfaches an Pchlide *a* (630 nm) enthalten. Oliver & Griffiths [1982] zeigen so *in vivo*, daß der Shibata-Shift bei doppelter Menge an Pchlide *a* (630 nm) statt 35 min nur 18 min, und bei 10-facher Menge nur 10 s dauert. Bei *in vitro* Versuchen an Etioplastenmembranen (ohne Detergens) konnte durch Zugabe von Pchlide *a* ebenfalls ein schneller Shibata-Shift induziert werden. Gleichzeitig wurde ein Anstieg der Absorption bei 650 nm beobachtet. Die Autoren schließen aus diesen Ergebnissen, daß *in vivo*, nach der Photoumwandlung, das *de novo* synthetisierte Pchlide *a* den Shibata-Shift auslöst, Chlide *a* frei wird und die POR neues Substrat bindet (Abb. 69).

Diese Schlußfolgerung kann durch die hier erzielten Resultate eindeutig bestätigt werden. Der Zusatz von exogenen Substraten nach der Photoumwandlung des endogenen Pchlide *a* löst die Verschiebung des Chlide *a* Maximums von 680 nm auf 672 nm aus und beschleunigt sie deutlich (Dauer 1 min) (Abb. 41 C, Spektrum 1 und D, Spektrum 1). Das Ausmaß der Verschiebung hängt von der Konzentration des angebotenen Pigments, hier Zn-Protopheide *a*, ab. Je mehr Pigment zugesetzt wird (Abb. 41 C, Spektrum 1 im Vergleich zu Spektrum 2), desto mehr kurzwelliges Chlide *a* entsteht.

Mit solubilisierten Etioplasten aus Gerste konnte die Verschiebung auch bei Zugabe von Pchlide *b* gezeigt werden [Scheumann *et al.* 1999]. In diesen Versuchen wurde das endogen vorhandene, photoaktive Pchlide *a* ebenfalls zunächst komplett umgewandelt. Nach Zusatz von Pchlide *b* und nachfolgender Belichtung wurde neben Chlide *b* erneut auch Chlide *a* gebildet. Dies bestätigt, daß die POR während der Shibata-Shift aus den gebildeten POR-NADPH-Chlide-Komplexen frei wird und nun auch ursprünglich nicht photokonvertierbares, endogenes Pchlide *a* binden kann.

Interessanterweise setzt die kurzwellige Verschiebung des Chlide *a* Maximums auch bei Zugabe von Chl *c₁* ein (Abb. 41 D, Spektrum 1). Dieses Pigment wird von der POR nicht reduziert (3.2.5). Der für Pchlide *a* bestimmte K_M -Wert wird jedoch fast um das 2-fache heraufgesetzt, wenn die POR vor Zugabe des Pigments mit Chl *c₁* inkubiert wird (Abb. 38). Da sich die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung von Pchlide *a* zu Chlide *a* dennoch nicht ändert, ist davon auszugehen, daß Chl *c₁* in der Lage ist, sich an das aktive Zentrum der POR zu binden, und die Reaktion somit kompetitiv zu hemmen. Die Verschiebung nach Chl *c₁* Zugabe bestätigt diese Ergebnis. Sie verläuft deutlich weniger ausgeprägt, als bei dem Zusatz einer vergleichbaren Menge von Zn-Protopheide *a* (Vergleich des Spektrums 1 Abb. 41 D mit Spektrum 1 Abb. 41 C). Die Affinität der POR zu Chl *c₁* ist im Vergleich zu Zn-Protopheide *a* vermutlich deutlich geringer. Dies erklärt auch die Fortsetzung der Verschiebung bei Zugabe einer kleiner Menge Zn-Protopheide *a* (Spektrum 2, Abb. 41 D) zu der Chl *c₁* enthaltenden Probe.

Der mögliche Reaktionsablauf in 30 % Glycerin Puffer ist in der oberen Hälfte des Schemas der Abbildung 72 zusammengefaßt. Hierbei ist davon auszugehen, daß Glycerin die Struktur der ternären Komplexe stabilisiert und diese somit bei der Belichtung erhalten bleiben. Dies würde auch den von mehreren Autoren beobachteten positiven Einfluß des Glycerins auf die Photoaktivität *in vitro* belegen (siehe auch Kap. 3.1.4).

Falls noch PLB-Fragmente (A650 nm) vorhanden sind, wird hier vorerst unterstellt, daß deren Struktur bei Belichtung aufgebrochen wird. Trotz Solubilisierung mit Detergens kann nur sehr wenig freies endogenes Pchlide *a* zur Verfügung stehen, da eine schnelle Verschiebung des Chlide *a* Maximums erst bei Zusatz von exogenem Substrat erfolgt.

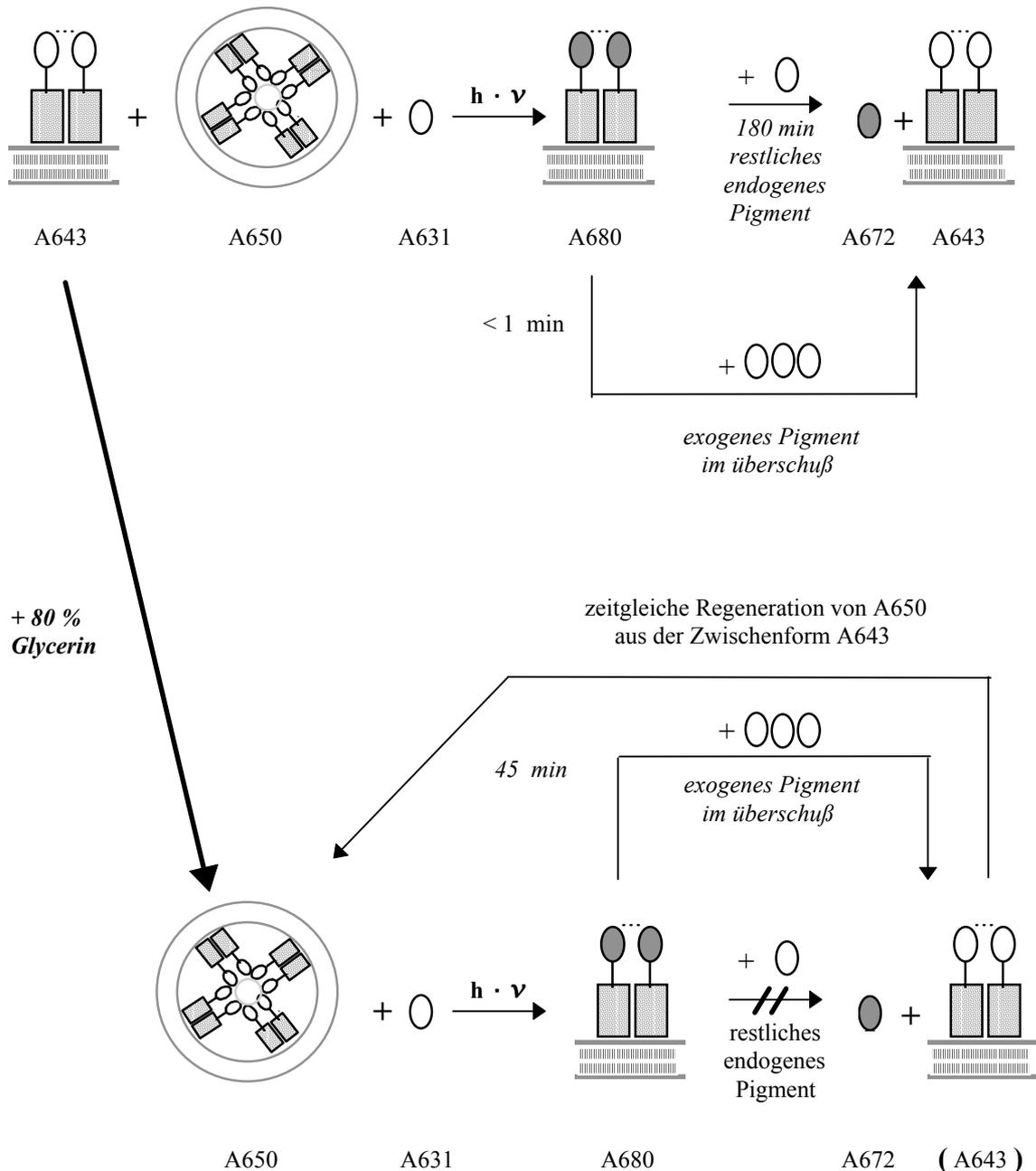


Abb. 73: Schematisches Modell zu den molekularen Ursachen der unterschiedlichen Absorptionsmaxima in solubilisierten Etioplastenmembranen in 30 % Glycerin und nach Dialyse gegen 80 % Glycerin.

● = Chlide *a*, andere Symbole siehe Abb. 70 und 72.

Die solubilisierten Etioplastenmembranen in 30 % Glycerin sind nicht dazu geeignet, alle *in vivo* auftretenden Verschiebungen vollständig darzustellen. Insbesondere die langwellige Form von Pchlid *a* bei A650 nm kann nicht erhalten werden.

Durch eine Dialyse dieser Fraktion gegen einen Puffer mit 80 % Glycerin gelingt es, bedingt durch den Wasserentzug in der Probe, ternäre Komplexe enger zusammenzubringen. Die Abbildung 42 zeigt, daß sich so das Pchlid *a* Maximum von A643 nm langwellig auf A650 nm (A640 nm und A654 nm im Differenzspektrum) verschiebt. Bei der Dialyse gegen 80 % Glycerin wird das Volumen der Probe deutlich verringert. Dieser Konzentrierungseffekt reicht nicht aus, um die Verschiebung von A643 nm auf A650 nm erklären zu können. Wird die Probe mit 80 % Glycerin-Puffer auf das Volumen vor der Dialyse zurückverdünnt, treten keine erneuten Verschiebungen auf.

Bei Belichtung der Probe (Abb. 43, A und B) wird fast ausschließlich Pchlid *a* A650 nm umgewandelt. Klare isosbestische Punkte bei A630 nm und A660 nm zeigen, daß es sich bei der Reaktion um einen monomolekularen Reaktionstyp handelt. Ähnlich der Situation *in vivo* bildet sich auch hier langwelliges Chlid *a* mit einem Absorptionsmaximum bei A680 nm. Kahn *et al.* [1970] konnten *in vitro* an PLB's (ohne Detergens) eine vergleichbare Photoumwandlung bei 65 % Glycerin durchführen. Die hohe Glycerinkonzentration führt dabei nicht zu einem Verlust der Aktivität der POR. Ein Vergleich der in Abbildung 43 A und B gezeigten Photoumwandlung zu der Photoumwandlung in 30 % Glycerin (Abb. 40 A und B) zeigt ebenfalls keine auffallend herabgesetzte Reaktionsgeschwindigkeit.

Der bereits beschriebene verzögernde Einfluß von Glycerin auf die Verschiebung des Chlid *a* Maximums von A680 zu A672 nm verstärkt sich in 80 % Glycerin nochmals deutlich. Während der Zeit, in der die Verschiebung in 30 % Glycerin vollständig abläuft (180 min - Abb. 41, A), verschiebt sich das Maximum in 80 % Glycerin nur um 1 nm (Abb. 44 A und B). Durch Zusatz von exogenem Pigment (Abb. 44 C und D), hier Pchlid *a*, läßt sich diese Verschiebung jedoch wieder herbeiführen, wobei sich gegenüber der Probe in 30 % Glycerin erhebliche Unterschiede zeigen. Zum einen dauert sie wesentlich länger, nämlich ca. 45 min statt 1 min (Abb. 44 E), zum anderen bildet sich nun auch aus dem endogenen Pchlid *a* (A632 nm, bzw. A628 nm im Differenzspektrum) - zeitlich parallel zur Verschiebung - eine langwellige Absorption bei A650 nm (A652 nm im Differenzspektrum) (Abb. 44 F). Durch weitere Belichtung kann gezeigt werden, daß es sich hierbei um photoaktives Pchlid *a* handelt, aus dem erneut langwelliges Chlid *a* (Abb. 44 G und H) gebildet wird.

Der gleiche Reaktionsablauf konnte auch durch die Zugabe von Zn-Protopheide *a* dargestellt werden [Klement *et al.* 2000]. Das langwellige Maximum dieses exogenen Pigments verschob sich während der 45-minütigen Inkubation im Dunkeln von A628 nm auf A646 nm. Nach der Belichtung zeigte das neu gebildete Zn-Pheide *a* ein Maximum bei A678 nm. Dabei konnte erstmals die Bildung eines längerwellig absorbierenden photoaktiven Pigments gezeigt werden, das strukturell nicht dem natürlichen Substrat der POR entspricht.

Die untere Hälfte der Abbildung 73 faßt die Ergebnisse der Untersuchungen in 80 % Glycerin nochmals zusammen. Die Bildung der langwelligen Pchlid *a* Absorption beruht nicht auf dem Konzentrierungseffekt in der Probe. Daher müssen sich aus den, an Membranen assoziierten ternären Komplexen Strukturen ausbilden, die den PLB-Strukturen ähnlich sind. Geringe Mengen an noch vorhandenem freien Pchlid *a* sind aufgrund der verstärkt verzögernden Wirkung des Glycerins nicht mehr in der Lage, die kurzwellige Verschiebung des Chlid *a* zu induzieren. Dies gelingt bei Zusatz von exogenem Pigment, wobei aus den

dabei neu (mit Pchlide *a*) entstehenden ternären Komplexen die vor der Belichtung bestehende Struktur zurückgebildet wird.

Die spektralen Verläufe in diesen Versuchen, insbesondere bei Pchlide *a*-Zusatz, ähneln nun deutlich der *in vivo* Situation (Abb. 69). Durch Erhöhung der Glycerinkonzentration konnten sowohl die langwellig absorbierende photoaktive Form von A650 nm dargestellt als auch die Verschiebung des Produktes nach der Belichtung gezeigt werden.

Man muß jedoch davon ausgehen, daß trotz Solubilisierung der Etioplastenmembranen, noch PLB-Fragmente vorhanden sein können. Die für solubilierte Etioplastenmembranen entwickelte Methode wurde daher in den nachfolgend diskutierten Versuchen auf die solubilierte und weitgehend aufgereinigte POR in der Fraktion Ü3 übertragen.

3.3.5.3 Spektrale Formen in der Fraktion Ü3

Das Absorptionsmaximum des Pchlide *a* bei A641 nm (Abb. 45 A) hat sich in 30 % Glycerin, im Vergleich zu der Etioplastenfraktion (Abb. 40 A), um 2 nm kurzwellig verschoben. Geht man davon aus, daß in der solubilierten Etioplastenfraktion und in der Fraktion Ü3 eine Mischung photoaktiver Pigmente vorliegt, die aus den *in vivo* Formen A638 nm und A650 nm hervorgehen, so kann man diese geringfügige Verschiebung mit dem Vorliegen eines höheren Anteils an A638 nm erklären. Prinzipiell sollte dann die Photoumwandlung in der Fraktion Ü3 ähnlich wie in der Etioplastenfraktion ablaufen. In den absoluten Spektren (Abb. 45 A) und insbesondere in den Differenzspektren (Abb. 45 B) ist jedoch zu erkennen, daß zu Beginn der Belichtung zunächst aus noch kürzerwelligerem Pchlide *a* (A635 nm) entsprechend kürzerwelliges Chlide *a* bei A672 nm gebildet wird. Erst mit fortschreitender Belichtungsdauer wird längerwelliges Pchlide *a* zu längerwelligem Chlide *a* umgewandelt (A680 nm). Dies ist bei der Photoumwandlung an der solubilierten Etioplastenfraktion nicht zu beobachten. Wie läßt sich dieser Unterschied erklären?

McEwen *et al.* [1996] machten *in vivo* vergleichbare Beobachtungen und konnten zeigen, daß die zu Beginn der Belichtung entstehende kurzwellige Form des Chlide *a* nicht etwa aus der sehr schnellen Shibata-Shift resultiert, sondern direkt aus der Umwandlung von kurzwelligem Pchlide *a* entsteht. Die Autoren schließen nicht aus, daß es sich hierbei um das bisher als nicht photokonvertierbar geltende Pchlide *a* [Kahn *et al.* 1970, Ryberg & Sundqvist 1982b] mit einem Maximum bei A628 nm handeln könnte. In diesem Zusammenhang sind auch die Ergebnisse von Böddi *et al.* [1998] zu sehen, die *in vivo* über Tieftemperatur-Fluoreszenzspektroskopie und FLN (Fluorescence Line Narrowing) nachweisen, daß in Epicotylen der Erbse zwei Pchlide *a* Formen in diesem kurzwelligen Bereich existieren. Sie interpretieren eine Form bei F628 nm als Pool von nicht POR-gebundenem Pchlide *a* und/oder Pchl, sowie eine zweite Form bei F634-636 nm als photokonvertierbares POR-gebundenes Pchlide *a*. Beide Formen liegen dabei monomer vor.

Aus den Ergebnissen des Kapitels 3.1 (3.1.2.2.3) geht hervor, daß während des Aufreinigungsschrittes zur Fraktion Ü3 das molare Verhältnis von Pchlide *a* zu POR gegenüber der Etioplastenfraktion geringfügig abnimmt. Wenn bei der Solubilisierung ein kleiner Teil des Pchlide *a* vom Enzym abgelöst wird, so ist es sehr wahrscheinlich, daß unter diesen Bedingungen dimere ternäre Komplexe zu monomeren ternären Komplexen gespalten werden. Diese könnten in dem kurzwelligen Bereich (A633 nm) absorbieren und bei Belichtung sofort zu Chlide *a* A672 nm umgewandelt werden. Aufgrund des Überschusses an POR ist es vorstellbar, daß nach der Photoumwandlung kein Substrat mehr zur Verfügung steht. Dies erklärt, warum hier in der Fraktion Ü3 - im Gegensatz zur Etioplastenfraktion - eine Verschiebung des Chlide *a* Maximums von A680 nm zu A672 nm nicht mehr auftritt. Es ist kein Substrat mehr vorhanden, das diese Verschiebung induzieren könnte.

Die Abbildung 46 A zeigt, daß der Zusatz von exogenem Pchlid *a*, ebenso wie in der Etioplastenfraction, sofort zu dieser Verschiebung führt. Zu beachten ist hierbei das Maximum des zugesetzten Pchlid *a*. Es liegt nicht etwa bei A633 nm, sondern bei A638 nm (Abb. 46 B). Dies spricht für einen raschen Austausch der Chlide *a*-Moleküle in den ternären Komplexen. Belichtet man erneut, entsteht wiederum ein Chlide *a* Maximum bei A680 nm.

In 80 % Glycerin-Puffer verläuft die Verschiebung des Maximums von Pchlid *a* bei A641 nm zu A649 nm (Abb. 47) ähnlich der Etioplastenfraction (Abb. 42). Auch die Photoumwandlung (Abb. 48) zeigt im Vergleich (Abb. 43) keine Unterschiede.

Inkubiert man die belichtete Probe nachfolgend im Dunkeln, tritt jedoch ein gravierender Unterschied hervor. Die Verschiebung des Chlide *a* A680 nm zu Chlide *a* A672 nm verläuft jetzt innerhalb von 90 min (Abb. 49 A), ohne daß exogenes Pigment zugesetzt werden muß. Zu dieser Verschiebung zeitlich eng gekoppelt, bildet sich neues photoaktives Pchlid *a* mit einem Maximum bei A649 nm aus. Es entsteht eindeutig aus einer sehr kurzweilig absorbierenden Form bei A629 nm (Abb. 49 B).

Es stellt sich somit die Frage, warum hier freies Pchlid *a* für eine Induktion der Verschiebung und die Regeneration von A650 nm zur Verfügung steht, während dies in solubilisierten Etioplasten in 80 % Glycerin nicht der Fall ist. Wie bereits erwähnt, treten bei 30 % Glycerin in der Fraktion Ü3, im Gegensatz zu der Etioplastenfraction, monomere, ternäre Komplexe mit einem kurzweiligem Absorptionsmaximum auf. Die einzige Erklärung für das Auftreten von größeren Mengen an freiem Pchlid *a* in 80 % Glycerin kann nur sein, daß diese Komplexe hier nicht mehr stabil sind und auseinanderbrechen.

3.3.5.4 *In vitro* Rekonstitution der spektralen Formen aus der Fraktion EL und rekombinanter POR (MBP-POR)

Die pigmentfrei, ohne Aktivitätsverlust zur Homogenität aufgereinigte POR in der Fraktion EL zeigt in 30 % Glycerin, unter Zusatz von Pchlid *a*, für dieses nur ein kurzweiliges Maximum bei A634 nm (Abb. 33 A). Die Belichtung führt direkt zu einem kurzweilig absorbierenden Maximum des Chlide *a* bei A672 nm. In 80 % Glycerin erfolgt aber weder eine Verschiebung des Pchlid *a* Maximums noch findet bei Belichtung eine Photoumwandlung statt. Diese Eigenschaften wurden erst nach Zusatz von Membranlipiden gefunden (siehe 3.3.3.3)

Etioplastenlipide bestehen zu 80 % aus Monogalactosyl-diacylglycerol (MGDG) und Digalactosyl-diacylglycerol (DGDG), wobei in den PLB's und PT's ein unterschiedliches molares Verhältnis vorliegt (MGDG : DGDG beträgt in PLB's 1,8, in PT's 1,2) [Ryberg *et al.* 1983]. Die Rekonstitutionsversuche wurden mit pigmentfreien Lipidmischungen (Abb. 55, Spur 2) aus weitgehend gereinigtem MGDG (Abb. 55, Spur 1), bzw. DGDG (Abb. 55, Spur 3) durchgeführt.

Neben der pigmentfreien und reinen POR (Fraktion EL) aus Hafer, wurde auch die in *E.coli* als Fusionsprotein mit MBP (Maltose Binde Protein) überexprimierte POR der Erbse eingesetzt.

Versuche an Etioplastenfractionen in 80 % Glycerin [Klement *et al.* 2000] haben ergeben, daß Zn-Protopheide *a*, im Vergleich zu Pchlid *a* ähnliche langwellige spektrale Formen und Verschiebungen bildet. Die Rekonstitutionsversuche wurden daher mit Zn-Protopheide *a* durchgeführt, da dieses Pigment, im Gegensatz zu Pchlid *a* sein Zentralatom nicht leicht verliert und zudem nicht zur Aggregation neigt (Abb. 68 A).

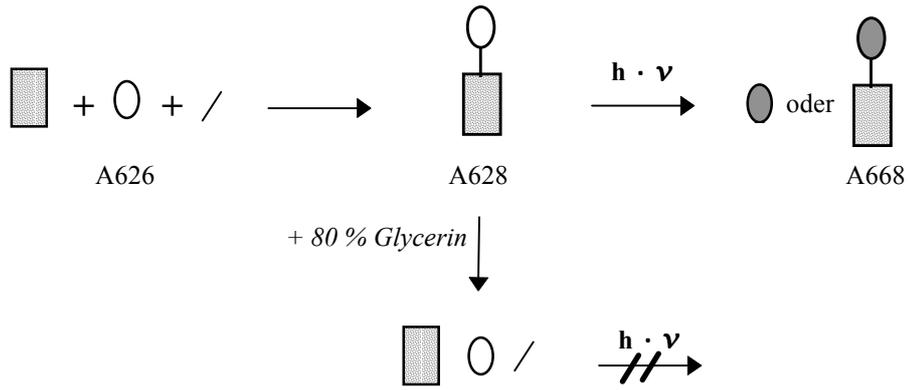
Zn-Protopheide *a* absorbiert in 30 % Glycerin ohne die Gegenwart der Lipidmischung (MGDG/DGDG) sowohl in der Fraktion EL aus Hafer (Abb. 26 G), als auch in der Fraktion mit gereinigter MBP-POR aus *E.coli* (Abb. 63) bei A627-A630 nm (Soretbande bei A439 nm). Nach der Belichtung entsteht jeweils kurzwelliges Zn-Pheide *a* mit einem Maximum bei A666-A668 nm. Die Maxima im Wellenlängenbereich von 600-700 nm sind mit den Werten vergleichbar, die bereits Griffiths [1980] bei der Photoumwandlung von Zn-Protopheide *a* in vorbelichteten Etioplastenpräparationen beobachtet hat. Wie bereits zu Anfang für Pchlide *a* beschrieben, erfolgt auch hier keine Photoreduktion in 80 % Glycerin Puffer. Das Schema in der Abbildung 74 A faßt die Reaktionen nochmals zusammen.

Setzt man der Fraktion EL die Zn-Protopheide *a*-Lipidmischung zu, ändert sich das Bild (Abb. 56 A). Während einer Inkubation im Dunkeln verschiebt sich das Maximum langwellig auf A636 nm und zeigt bei A646 nm eine Schulter. Aus dem Differenzspektrum (Abb. 56 B) geht hervor, daß das Maximum bei A636 nm dabei hauptsächlich durch die Umwandlung der Form bei A627 nm zu A646 nm (A435 nm zu A451 nm) entsteht. Das nach der Belichtung aus der langwelligen Form resultierende Produkt bei A673 nm (Abb. 56 C) ist nun ebenfalls langwellig verschoben. In gleichartigen Versuchen mit der MBP-POR (Abb. 64) sind diese Verschiebungen nicht so stark ausgeprägt. Eine geringfügige langwellige Verschiebung des Eduktes (um 3) nm erfolgt aber auch hier. Dies wird im Vergleich der Differenzspektren aus der Photoumwandlung (Vergleich: Abb. 64 mit Abb. 63) deutlich. Offensichtlich werden hier weniger langwellige Komplexe als mit der POR der Fraktion EL gebildet.

Mit der Fraktion EL zeigt sich in Versuchen mit 80 % Glycerin die Ausbildung einer langwelligen photoaktiven Form von Zn-Protopheide *a* bei A646 nm (Abb. 57). Hierbei kann ausgeschlossen werden, daß diese Absorption auf hochaggregierte Pigmentmoleküle zurückzuführen ist. Zn-Protopheide *a* und Pchlide *a* unterscheiden sich in ihren Absorptionsmaxima in der Soretbande nur geringfügig (Abb. 33 A und G). Hochaggregierte Pchlide *a* Moleküle zeigen aber in 30 % Glycerin ein zusätzliches, ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei A472 nm (Abb. 68 A). Ein vergleichbares Maximum für Zn-Protopheide *a* ist in der Abbildung 57 nicht zu sehen. Im Übrigen ist die Aggregation von Pchlide *a* nur in Abwesenheit von POR oder bei einem großen Überschuß des Pigments gegenüber der POR möglich (Abb. 68). In 80 % Glycerinpuffer ist die Aggregation auch ohne die Anwesenheit des Enzyms nicht zu beobachten.

Das bei der Photoumwandlung entstehende Produkt ist mit A678 nm stark langwellig verschoben. Die Maxima entsprechen denen der endogenen Mg-haltigen Pigmente (A649-650 nm, respektive A680 nm) in der Etioplastenfraktion (Abb. 43) und der Fraktion Ü3 (Abb. 48).

A:



B:

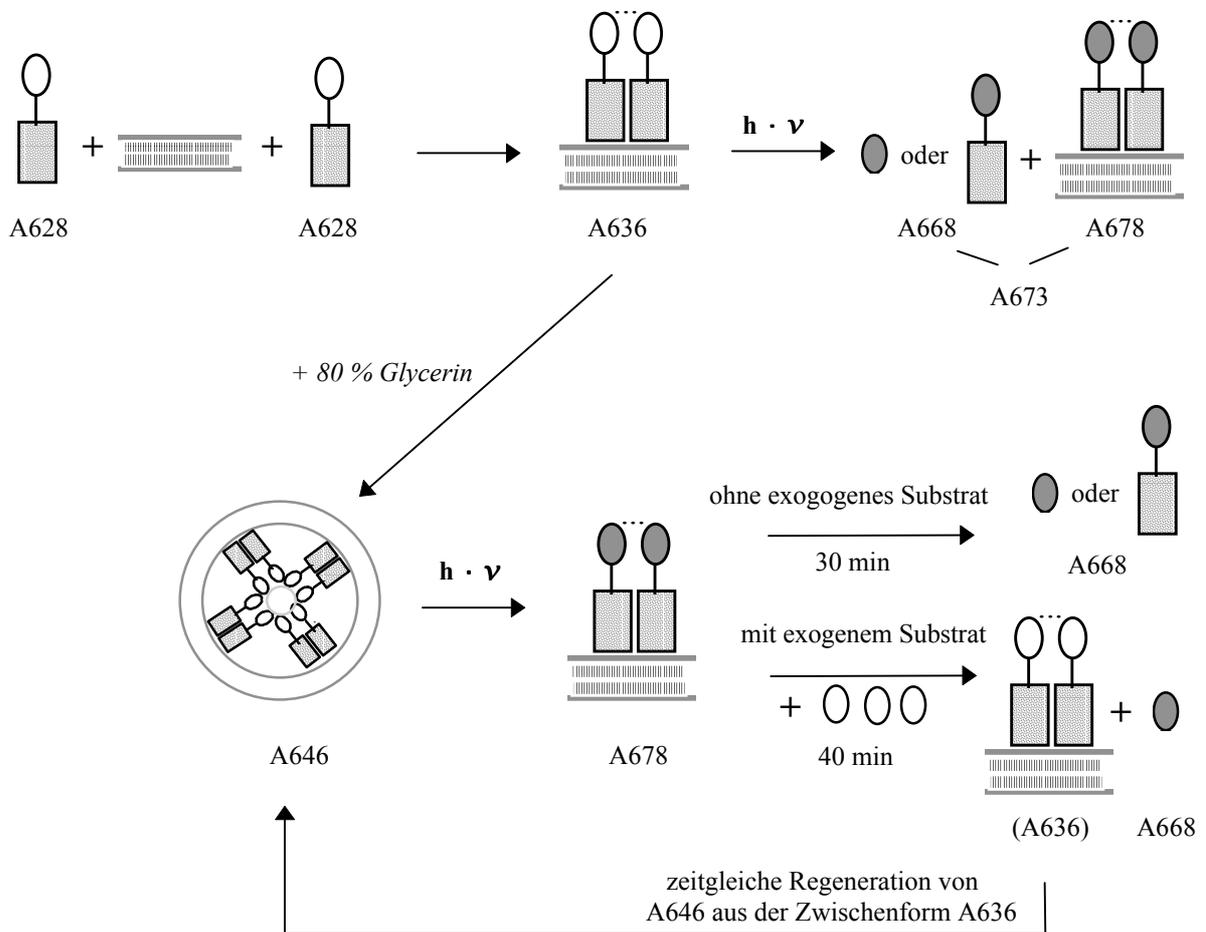


Abb. 74: Schematisches Modell zu den molekularen Ursachen der unterschiedlichen Absorptionsmaxima von Zn-Protopheide a , respektive Zn-Pheide a in der Fraktion EL ohne die Gegenwart von Lipiden (A) und mit Lipiden (B), jeweils vor und nach der Dialyse gegen 80 % Glycerin.

Die Bildung von langwelligen Edukten und Produkten spricht bereits für eine erfolgreiche Rekonstitution von Komplexen, die denen *in vivo* gleichen.

Diese Ähnlichkeit zeigt sich noch deutlicher bei der Inkubation im Dunkeln. Die Maxima der langwelligen Produkte verschieben sich sowohl in der Fraktion EL (Abb. 58), als auch in der MBP-POR Fraktion (Abb. 66 A und B) kurzwellig von A678 nm auf A668 nm, respektive von A675 nm auf A664 nm. Die Verschiebung verläuft aber deutlich schneller als in der Fraktion Ü3 (Abb. 49) und ohne eine gleichzeitige Regeneration von neuen langwelligen Edukt-Komplexen. Unter Umständen sind die ternären Komplexe instabiler als endogene Produkt-Komplexe und Zn-Pheide *a* wird leichter freigesetzt. Eine Dissoziation dimerer in monomere Produkt-Komplexe ist ebenfalls vorstellbar.

Die Regeneration von langwelligem Zn-Protopheide *a* innerhalb von 40 min (Abb. 59) kann gezeigt werden, indem man direkt nach der Belichtung weiteres Substrat (A630 nm) zusetzt. Im Vergleich zwischen der zeitlich parallel verlaufenden kurzwelligen Verschiebung ohne Regeneration von A646 nm (Abb. 58, Differenzspektrum), ist die Verschiebung unter Beteiligung der Regeneration deutlich ausgeprägter (Abb. 59, Spektrum 2). Die induzierende Wirkung von freiem Substrat auf die Verschiebung zeigt sich also auch hier, wobei die regenerierte Form A646 nm photokonvertierbar ist (Abb. 60).

Das schematische Modell in der Abbildung 74 B gibt einen Überblick zu dem Reaktionsablauf der Rekonstitutionsversuche. Der in der oberen Hälfte des Schemas skizzierte Verlauf in 30 % Glycerin zeigt die Bildung dimerer Komplexe (A636 nm) unter dem Einfluß der Lipide. Bei deren Photoumwandlung dissoziieren sie (A678 nm) vermutlich teilweise schnell in Monomere (A668 nm) oder Zn-Pheide *a* (A668 nm) wird schnell freigesetzt. Aus der Mischung dieser Formen entsteht die Absorption bei A673 nm. Die untere Hälfte des Schemas zeigt die Rekonstitution der langwelligen Edukte (A646 nm), deren Photoumwandlung (A678 nm) und Regeneration in Gegenwart von 80 % Glycerin und überschüssigem Substrat.

In den Versuchen mit der MBP-POR in 80 % Glycerin ist die Ausbeute an Photoprodukt geringer, und die Regeneration einer langwelligen Form benötigt erheblich mehr Zeit als in den Versuchen mit der Fraktion EL. Zur Ursache der im Prinzip gleichartigen aber doch weniger effektiven Reaktionen der überexprimierten MBP-POR im Vergleich zur POR aus Hafer kann nur vermutet werden, daß die Bindung des MBP an die POR störend wirkt.

Die Rekonstitutionsversuche liefern erstmals den eindeutigen Nachweis, daß der Einfluß von Lipiden in direktem Zusammenhang mit den spektralen Abläufen *in vitro* stehen. Aufgrund der Vergleichbarkeit mit den spektralen Formen und Verschiebungen *in vivo* ist davon auszugehen, daß bei diesen Versuchen Komplexe und Strukturen gebildet werden, die denen *in vivo* (PLB's) stark ähneln. Wie kann die Entstehung derartiger Strukturen *in vitro* erklärt werden?

Shipley *et al.* [1973] sowie Brentel *et al.* [1985] konnten zeigen, daß MGDG und DGDG in wäßrigen Systemen unterschiedliche Phasen bilden. Membranen aus MGDG krümmen sich und bilden hexagonale Phasen, während DGDG lamellare Phasen bildet (Abb. 75). Der Grund hierfür liegt nicht zuletzt in der Form der Moleküle [Israelachvili *et al.* 1980, Rilfors *et al.* 1984]. MGDG hat eine kleine polare Kopfgruppe und zeigt eine konische Form, während DGDG mit der größeren Kopfgruppe eine zylindrische Form bildet.

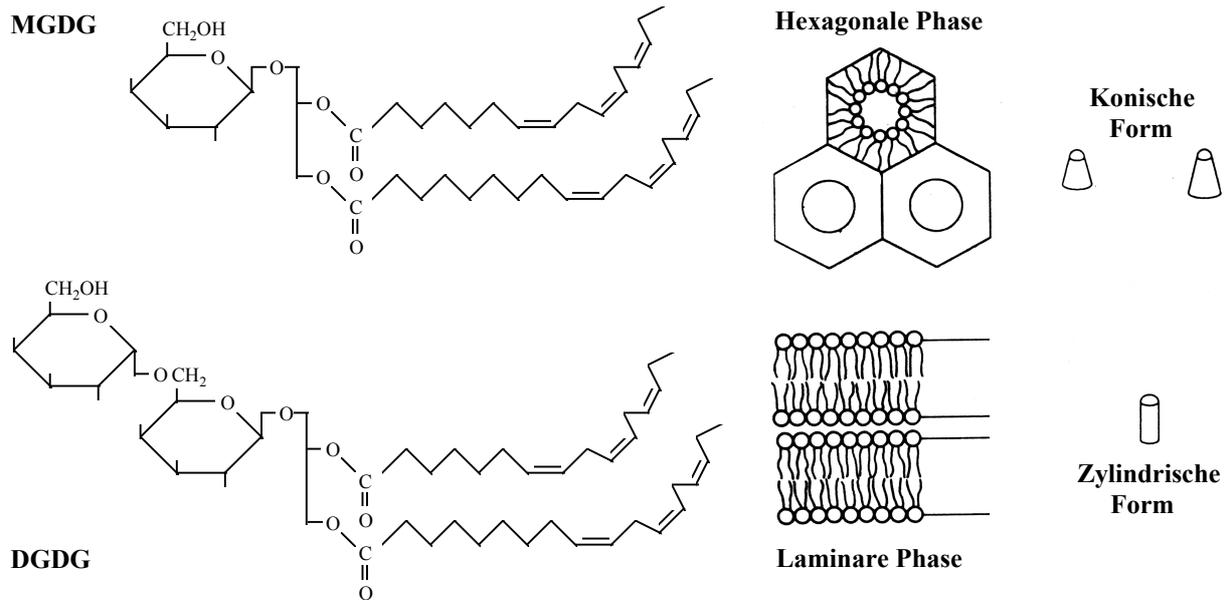


Abb. 75: Strukturformeln von MGDG/DGDG sowie Modelle zu dem unterschiedlichen Phasenverhalten (nach Selstam & Widell-Wigge [1993]) der beiden neutralen Lipide in Wasser.

In Mischungen von deuteriertem Wasser, MGDG und DGDG bildet sich eine laminare Phase, wenn der Gehalt an MGDG niedrig ist. Ist mehr MGDG enthalten bildet sich eine hexagonale Phase. Neben diesen beiden Phasen bildet sich bei einem Überschuß an MGDG und bei niedrigen Wassergehalten eine dritte, die sogenannte kubische Phase [Brentel *et al.* 1985]. Das entsprechende Phasendiagramm ist zur Verdeutlichung in der Abbildung 76 wiedergegeben. Ein Strukturmodell einer 4-armigen kubischen Phase ist bereits in der Abbildung 71 gezeigt.

In einer Mischung von deuteriertem Wasser und Chloroplastenlipiden, deren Zusammensetzung sich nicht wesentlich von Etioplasten unterscheidet, wurde die Bildung einer 3-armigen kubischen Phase bei Wassergehalten zwischen 5 und 13 % beobachtet [Selstam *et al.* 1990].

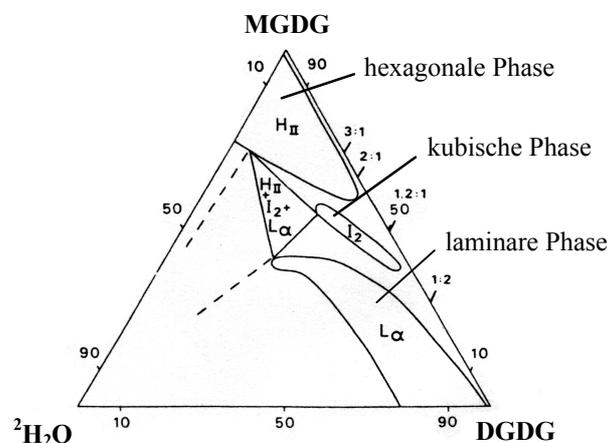


Abb. 75: Ternäres Phasendiagramm des $^2\text{H}_2\text{O}/\text{MGDG}/\text{DGDG}$ Systems nach Lindblom & Rilfors [1989].

Man kann davon ausgehen, daß sich in den durchgeführten Rekonstitutionsversuchen, bedingt durch den niedrigen Wassergehalt, derartige Strukturen gebildet haben. Bei dem Phasenübergang von der lamellaren in die kubische Phase gelangen membranassoziierte ternäre Komplexe vermehrt in die inneren Wasserkanäle. Die Ergebnisse von Chadhi *et al.* [1998] zeigen, daß Pchlid *a* (A640 nm) vermutlich an dimere POR-Moleküle gebunden ist. Geht man davon aus, daß die kürzerwelligen photoaktiven Komplexe (A633 nm) aus Monomeren bestehen, so kann lässt sich aus den Ergebnissen der Rekonstitutionsversuche folgern, daß die Lipide an der Dimerisierung beteiligt sind, bzw. die Dimeren stabilisieren. Da offensichtlich nur aus solchen langwellig absorbierenden Dimeren (A641-643 nm in Etioplasten und der Fraktion Ü3) die A650 nm Form in kubischen Phasen gebildet wird, liegen dort vermutlich ebenfalls Dimere vor. Diese Komplexe sind räumlich so dicht zusammen, daß Wechselwirkungen zwischen den Pigmenten auftreten können. Dies erklärt das Entstehen der langwelligen Absorptionsmaxima für die Edukte (Abb. 57, A646 nm für Zn-Protophyde *a*).

Aus beiden längerwellig absorbierenden dimeren Komplexen (A641-A643 nm und A650 nm) entsteht ein langwelliges Chlide *a* (A680 nm). In Untersuchungen mit Fluoreszenzspektroskopie bei Tieftemperatur konnte gezeigt werden, daß die langwellige Form des Chlide *a* bei A680 nm (F685 nm) nach einer teilweisen Photokonversion (50 %) von A650 nm noch in enger räumlicher Beziehung zu dieser Form steht (Abb. 52). Zwischen beiden Formen war deutlich eine Energieübertragung festzustellen. Dies zeigt, daß die dimeren Komplexe vermutlich erhalten bleiben und die Verschiebung nach A672 nm nur durch einen Pigmenttausch erklärbar sein kann. Dabei verdrängt freies Substrat (A629-630 nm) das noch im dimeren Komplex gebundene Chlide *a* (A680 nm). Das frei werdende Chlide *a* absorbiert dann, genauso wie in monomeren Komplexen, bei A672 nm. Es ist verständlich, daß sich die kubische Struktur während der Belichtung oder kurz danach auflösen muß, damit dieser Austausch ermöglicht wird. Der Shibata-Shift wird auch *in vivo* mit der Auflösung der PLB-Struktur in Zusammenhang gebracht [Ryberg & Dehesh 1986, Artus *et al.* 1992].

Aus den mit Pchlid *a* neu beladenen, verbliebenen Dimeren entstehen bei einer Inkubation im Dunkeln neue kubische Phasen, in denen das Absorptionsmaximum des Pchlid *a* wieder bei A650 nm liegt. Auch Minkov *et al.* [1988] zeigen *in vivo*, daß sich während einer Dunkelinkubation nach erfolgter Belichtung Strukturen ausbilden, die den ursprünglichen PLB-Strukturen stark ähneln.

Überträgt man die hier anhand von *in vitro* Ergebnissen erstellten Modelle auf die *in vivo* Situation, ergibt sich für die molekularen Vorgänge vor und nach Belichtung etiologischer Angiospermen folgendes Bild.

Die POR ist vermutlich als dimerer, ternärer Komplex an die Membranen der Prolamellarkörper assoziiert. Die spektral unterschiedlich photoaktiven Komplexe (A650 nm, A638 nm) kommen durch eine unterschiedliche Lokalisation innerhalb dieser PLB's zustande. Die Komplexe mit einem Absorptionsmaximum bei A650 nm befinden sich dicht aneinander gedrängt auf Seite der inneren Wasserkanäle der PLB's. Das ergibt die von vielen Autoren beschriebene Wechselwirkung zwischen vielen Pigmenten, ohne daß die Proteine notwendigerweise entsprechend große Aggregate ausbilden müssen. Die Komplexe mit dem kürzerwelligen Maximum bei A638 nm sind den äußeren Wasserkanälen zugewandt, so daß die Pigmente der Dimeren nicht mit weiteren Pigmenten in Wechselwirkung treten (Abb. 76).

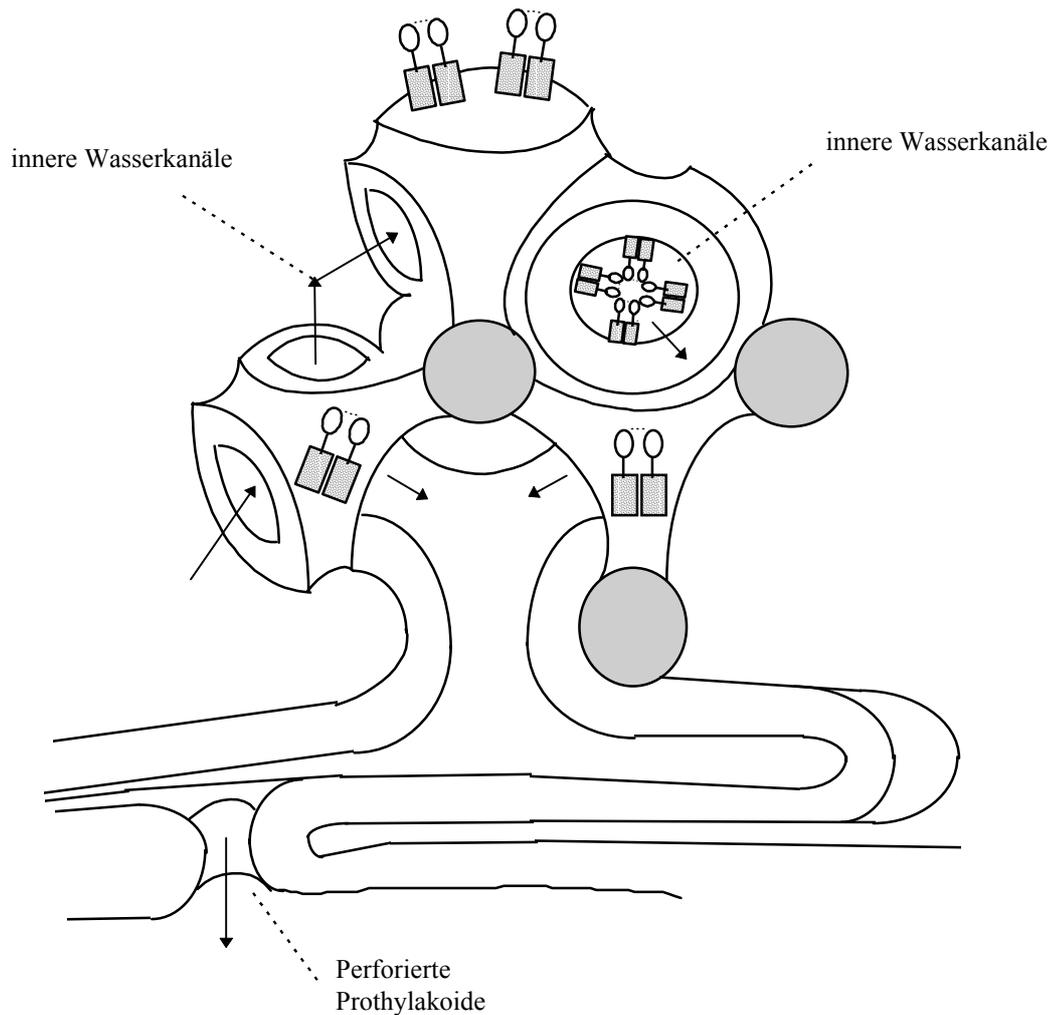


Abb. 76: Schematische Darstellung zur kubischen Struktur der PLB's in Etioplasten mit assoziierten Prothylakoid Membranen.

Dimere PSII-Komplexe sind vereinzelt in äußeren Wasserkanälen, dicht gepackte Dimere in den inneren Wasserkanälen dargestellt.

Während oder kurz nach der Belichtung kommt es zu einer Auflösung der kubischen Struktur. Die aus den zuvor unterschiedlich absorbierenden Komplexen entstehenden Dimere unterscheiden sich somit spektral nicht mehr. Der Shibata-Shift des langwelligen Chl *a* A680 nm zu A672 nm, ist in der Freisetzung der Chl *a* Moleküle aus den dimeren, ternären Komplexen begründet. Das freie Chl *a* wird von der Chlorophyll-Synthase verestert. Erfolgt eine Inkubation im Dunkeln, bindet sich parallel zur Freisetzung des Chl *a* freies Pchl *a* an die Dimere und die PLB-Struktur wird wieder zurückgebildet. Kommt es nicht zu dieser Regeneration wird die PORA, nicht jedoch die PORB proteolytisch abgebaut. Die Fähigkeit zur Bildung von PLB-Strukturen kann im Übrigen nicht spezifisch einer dieser isomeren Formen zugeordnet werden [Sperling *et al.* 1998].

Trotz der besonders in den letzten zehn Jahren erzielten Fortschritte zum Verständnis der Photoumwandlung, werden die noch offenen Fragen, speziell zum Mechanismus der Katalyse, erst nach Vorliegen kristallographischer Daten zur POR geklärt werden können. Die in dieser Arbeit vorgestellten Methoden und Ergebnisse können dazu beitragen, die Kristallisation zu ermöglichen. Die Voraussetzungen hierfür sind mit der zur Homogenität aufgereinigten und in Detergens nicht denaturierenden POR gegeben. Landau & Rosenbusch [1996] konnten mit Hilfe kubischer Phasen, das Membranprotein Bakteriorhodopsin dreidimensional kristallisieren. Die Röntgenstrukturanalyse lieferte dabei eine Auflösung von 2,5 Å [Pebay-Peroula *et al.* 1997]. Die hier demonstrierte Fähigkeit der POR, sich ohne Aktivitätsverlust in eine „künstliche“ Lipidumgebung zu integrieren, bietet eine vielversprechende Grundlage für die Kristallisation in kubischen Phasen.

4 ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wurde eine Methode entwickelt, die POR nach der Solubilisierung aus Etioplasten chromatographisch zur Homogenität zu reinigen. Die spezifische Aktivität konnte gegenüber der POR in Etioplasten annähernd um das 14-fache gesteigert werden. Dabei wurden alle endogenen Pigmente und Lipide abgetrennt. So konnte erstmals überzeugend mit isolierter POR aus Pflanzen gezeigt werden, daß eine Bindung an das Substrat oder das Vorhandensein einer Membranumgebung keine Voraussetzung für den Erhalt der Aktivität darstellt.
2. Mittels detaillierter Pigment- und Proteinanalysen, inklusive densitometrischer Verfahren, konnte nachgewiesen werden, daß in Etioplasten ein Molekül Pchlide *a* an ein Molekül POR gebunden ist.
3. Substratspezifitätsstudien mit Substratanalogen zu Pchlide *a* zeigten, daß strukturelle Veränderungen an den Seitenketten des Porphyrinringes A und B, nicht aber Modifikationen am Ring D oder am isozyklischen Ring E, von der POR akzeptiert werden und zu photokonvertierbaren Substraten führen. Die Ergebnisse dieser Versuche lieferten ein neues Modell zu dem Mechanismus der Katalyse. Demzufolge sind die Ringe D und E am Boden der Enzymtasche fixiert und eine Enolatbildung an der Carbonylgruppe des Ringes E an der die Reaktion beteiligt. Die Ringe A und B liegen mehr oder weniger außerhalb der Enzymtasche.
Erstmals konnte die Photokonvertierbarkeit von Pchlide *b*, Zn-[3-acetyl]-Protopheide *a* und Zn-[3-formyl]-Protopheide *a* gezeigt werden.
4. Kinetische Untersuchungen mit den Substratanalogen stellten die Auswirkungen der verschiedenen Seitenkettenmodifikationen auf die Reaktionsgeschwindigkeit heraus. Die Pigmente ließen sich in drei Gruppen mit einer „schnellen“ (z. B. Pchlide *a*), einer „mittelschnellen“ (z. B. [8-Vinyl]-Pchlide *a*) und einer „langsamen“ (z. B. Zn-7¹-OH-Protopheide *a*) Reaktionsgeschwindigkeit einteilen. Ein komplementärer Zusammenhang zwischen Fluoreszenz- und Photoreaktion-Quantenausbeute konnte nicht festgestellt werden.
5. Über die Bestimmung der K_M -Werte für Pchlide *a* und Pchlide *b* (0,47 μ M, respektive 0,63 μ M) wurde demonstriert daß die Affinität beider Pigmente zu der PORA aus Hafer annähernd gleich groß ist. Chlorophyll *c*₁ konnte als kompetitiver Hemmstoff für die POR identifiziert werden.
6. Bei der Photoreduktion tritt Substrathemmung auf. Dies konnte bei einem Überschuß an Pchlide *a* oder Pchlide *b* gegenüber der POR (> 1 mol Substrat/1 mol POR) gezeigt werden.
7. An solubilisierten Etioplastenmembranen und an solubilisierter, weitgehend aufgereinigter POR konnten die unterschiedlichen spektralen *in vivo*-Formen des photoaktiven endogenen Pchlide *a* dargestellt werden. Die nach der Photoreduktion auftretende spektrale Verschiebung des Chlide *a* (von A680 nm nach A672 nm), die mit dem *in vivo* auftretenden Shibata-Shift vergleichbar ist, konnte in diesen Proben gezeigt werden. Die in der Literatur postulierte Ursache des Shibata-Shift's, eine Freisetzung des

Chlide *a* aus den ternären Komplexen (POR-NADPH-Chlide *a*), kann anhand der hier erzielten Ergebnisse bestätigt werden.

8. Es wurde eine Methode entwickelt, mit deren Hilfe an solubilisierter und zur Homogenität gereinigter POR erstmals der Einfluß von Lipiden auf den spektralen Verlauf der Photoreduktion gezeigt werden kann. Nach der Dialyse einer Mischung von Einzelkomponenten (gereinigte POR, NADPH, MGDG/DGDG/Zn-Protopheide *a*-Gemisch) gegen 80 % Glycerin konnte die Photoumwandlung langwellig-absorbierender ternärer Komplexe, sowie die mit dem Shibata-Shift vergleichbare Verschiebung des Produktes *in vitro* dargestellt werden.
9. Die Ergebnisse dieser Rekonstitutionsversuche weisen darauf hin, daß *in vivo* die Einbettung der ternären Komplexe in die spezielle Lipidumgebung der Prolamellarkörper für die Bildung von unterschiedlich absorbierenden spektralen Formen des photoaktiven Pchlids *a* verantwortlich sind.

5 LITERATURVERZEICHNIS

Adamson H.Y., Hiler R.G. und Walmsley J. (1997):

Protochlorophyllide reduction and greening in angiosperms: An evolutionary perspective.

J. Photochem. Photobiol. B Biol **41**, 201-221

Akhtar M. (1991):

Mechanism and stereochemistry of the enzymes involved in the conversion of uroporphyriniogen III to haem.

in „Biosynthesis of tetrapyrroles“.

(Ed. Jordan P.M.), 67-99 (Elsevier, Amsterdam)

Akhtar M. (1994):

The modification of acetate and propionate side chains during the biosynthesis of haem and chlorophylls: mechanistic and stereochemical studies.

in „The biosynthesis of tetrapyrrole pigments“.

(Eds. Chadwick D.J. und Ackril, K.) Ciba Symposium **180**, 131-155 (John Wiley and Sons, Chichester)

Apel K., Santel H.-J., Redlinger T.E. und Falk H. (1980):

The protochlorophyllide holochrome of barley (*Hordeum vulgare* L.). Isolation and characterization of the NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase.

Eur. J. Biochem. **111**, 251-258

Armstrong G.A., Runge S., Frick G., Sperling U. und Apel K. (1995):

Identification of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases A and B: A branched pathway for light-dependent chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*.

Plant Physiol. **108**, 1505-1517

Armstrong G.A., Apel K. und Rüdiger W. (2000):

Does a light-harvesting protochlorophyllide *a/b*-binding protein complex exist?

Trends Plant Sci. **5**, 40-44

Artus N.N., Ryberg M., Lindsten, A., Ryberg H. und Sundqvist C. (1992):

The shibata shift and the transformation of etioplast to chloroplast in wheat with Clomazone (FMC 57020) and Amiprofos-methyl (Tokunol M).

Plant Physiol. **98**, 253-263

Avissar Y.J. und Moberg P.A. (1995):

The common origins of the pigments of life - Early steps of chlorophyll biosynthesis.

Photosynth. Res. **44**, 221-242

Baker M.E. (1994):

Protochlorophyllide reductase is homologous to human carbonyl reductase and pig 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase.

Biochem. J. **300**, 605-607

Beale S.I. (1999):

Enzymes of chlorophyll biosynthesis.
Photosynth. Res. **60**, 43-73

Beer N.S. und Griffiths W.T. (1981):

Purification of the enzyme NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase.
Biochem. J. **195**, 83-92

Begley T.P. und Young H. (1989):

Protochlorophyllide reductase. 1. Determination of the regiochemistry and the stereochemistry of the reduction of protochlorophyllide to chlorophyllide.
J. Am. Chem. Soc. **111**, 3095-3096

Begley T.P. (1994):

Photoenzymes: a novel class of biological catalysts.
Acc. Chem. Res. **27**, 394-401

Benli M., Schulz R. und Apel K. (1991):

Effect of light on the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase of *Arabidopsis thaliana*.
Plant Molecular Biology **16**, 615-625

Birve S.J., Selstam E. und Johansson L. B.-Ä. (1996):

Secondary structure of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase examined by circular dichroism and prediction methods.
Biochem. J. **317**, 549-555

Boardman N.K. (1962):

Studies on a protochlorophyll-protein complex.
Biochim. Biophys. Acta **62**, 63-79

Böddi B., Lindsten A., Ryberg M. und Sundqvist C. (1989):

On the aggregational states of protochlorophyllide and its protein complexes in wheat etioplasts.
Pysiol. Plant. **76**, 135-143

Böddi B., Lindsten A., Ryberg M. und Sundqvist C. (1990):

Phototransformation of aggregated forms of protochlorophyllide in isolated etioplast inner membranes.
Photochem. Photobiol. **52** (1), 83-87

Böddi B., Ryberg M. und Sundqvist C. (1991):

The formation of a short-wavelength chlorophyllide from a partial phototransformation of protochlorophyllide in etioplast inner membranes.
Photochem. Photobiol. **53** (5), 667-673

- Böddi B.**, Kis-Petik K., Kaposi A.D., Fidy J. und Sundqvist C. (1998):
The two spectroscopically different short wavelength protochlorophyllide forms in pea epicotyls are both monomeric.
Biochim. Biophys. Acta **1365**, 531-540
- Bradford M.M.** (1976):
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. **72**, 248-254.
- Brentel I.**, Selstam E. und Lindblom G. (1985):
Phase equilibria of mixtures of plant galactolipids. The formation of a bicontinuous cubic phase.
Biochim. Biophys. Acta **812**, 816-826
- Brodersen P.** (1976):
Factors affecting the photoconversion of protochlorophyllide to chlorophyllide in etioplast membranes isolated from barley.
Photosynthetica **10**, 33-39
- Brouers M.**, Michel-Wolwertz M.-R. (1983):
Estimation of protochlorophyll(ide) contents in plant extracts: re-evaluation of the molar absorption coefficient of protochlorophyll(ide).
Photosyn. Res. **4**, 265-270
- Butler W.L.** und Briggs W.R. (1966):
The relation between structure and pigments during the first stages of proplastid greening.
Biochim. Biophys. Acta **112**, 45-53
- Canaani O.D.** und Sauer K. (1977):
Analysis of subunit structure of protochlorophyllide holochrome by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
Plant Physiol. **60**, 422-429
- Carey E.E.**, Tripathy B.C. und Rebeiz C.A. (1985):
Chloroplast biogenesis 51: Modulation of monovinyl and divinyl protochlorophyllide biosynthesis by light and darkness *in vitro*.
Plant Physiol. **79**, 1059-1063
- Cavaleiro J.A.S.**, Kenner J.W. und Smith K.M. (1974):
Pyrroles and related compounds. XXXII. Biosynthesis of protoporphyrin IX from coproporphyrin III.
J.Chem. Soc. Perkin Trans. **1974**, 1188-1194

- Chahdi M.A.O.**, Schoefs B. und Franck F. (1998):
Isolation and characterization of photoactive complexes of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase from wheat.
Planta **206**, 673-680
- Dahlin C.**, Aronsson H., Almkvist J. und Sundqvist C. (2000):
Protochlorophyllide-independent import of two NADPH:Pchlde oxidoreductase proteins (PORA and PORB) from barley into isolated plastids.
Physiol. Plant. **109**, 298-303
- Dujardin E.** und Sirnoval C. (1970):
The reduction of protochlorophyllide into chlorophyllide.
Photosynthetica **4** (2), 129-138
- Eichacker L.**, Edhofer I. und Wanner G. (1996):
Cryopreservation of chlorophyll synthesis and apoprotein stabilization in barley etioplasts.
Plant Physiol. **112**, 633-639
- Ellsworth R.K.**, Dullaghan J.P. und St. Pierre M.E. (1974):
The reaction mechanism of *S*-adenosyl-L-methionine: Mg protoporphyrin IX methyltransferase of wheat.
Photosynthetica **8**, 375-383
- Eullaffroy P.**, Salvetat R., Franck F. und Popovic R. (1995):
Temperature dependence of chlorophyll(ide) spectral shifts and photoactive protochlorophyllide regeneration after flash in etiolated barley leaves.
Photochem. and Photobiol **62** (4), 751-756
- Mc Ewen B.**, Sundqvist C. und Younis S. (1994):
Protochlorophyll(ide) forms in hypocotyls of dark-grown bean (*Phaseolus vulgaris*).
Physiol. Plant. **90**, 396-407
- Mc Ewen B.**, Seyyedi M., Younis S. und Sundqvist C. (1996):
Formation of short-wavelength chlorophyll(ide) after brief irradiation is correlated with the occurrence of protochlorophyll(ide) 636-642 in dark-grown epi- and hypocotyls of bean (*Phaseolus vulgaris*).
Physiol. Plant. **96**, 51-58
- Fischer H.** und Stern A. (1940):
Chlorin e₆-dimethylester.
in „Die Chemie des Pyrrols. 2. Pyrrolfarbstoffe“.
(Eds. Fischer H. und Orth H.), 98 (Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig)
- Franck F.** und Mathis P. (1980):
A short lived intermediate in the photo-enzymatic reduction of protochlorophyll(ide) into chlorophyll(ide) at a physiological temperature.
Photochem. Photobiol. **32**, 799-803

- Fuesler T.P.**, Wong J.-S. und Castelfranco P.A. (1984):
Localization of Mg-chelatase and Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester (oxidative) cyclase activities within isolated, developing cucumber chloroplasts.
Plant. Physiol. **75**, 662-664
- Fujita Y.** (1996):
Protochlorophyllide reduction: A key step in the greening of plants.
Plant Cell Physiol. **37** (4), 411-421
- Gassman M.L.** (1973):
The conversion of photoinactive protochlorophyllide 633 to phototransformable protochlorophyllide 650 in etiolated bean leaves treated with δ -aminolevulinic acid.
Plant Physiol. **52**, 590-594
- Gassman M.** und Bogorad L. (1967):
Studies on the regeneration of protochlorophyllide after brief illumination of etiolated bean leaves.
Plant Physiol. **42**, 781-784
- Gassman M.**, Granick S. und Mauzerall D. (1968):
A rapid spectral change in etiolated red kidney bean leaves following phototransformation of protochlorophyllide.
Biochim. Biophys. Res. Commun. **32**, 295-300
- Gibson K.D.**, Laver W.G. und Neuberger A. (1958):
Formation of δ -aminolaevulinic acid *in vitro* from succinyl-coenzyme a and glycine.
Biochem. J. **70**, 71-81
- Gibson L.C.**, Willows R.D., Kannangara C.G., von Wettstein D. und Hunter C.N. (1995):
Magnesium-protoporphyrin chelatase of *Rhodobacter sphaeroides*: Reconstitution of activity by combining the products of the *bchH*, *-I*, and *-D* genes expressed in *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 1941-1944
- Granick S.** (1961):
The pigments of the biosynthetic chain of chlorophyll and their interactions with light.
in „Proc. 5th Intern. Congr. Biochem. Moscow“.
Vol. **V**, 176 (Pergamon Press Ltd., Oxford)
- Grevby C.**, Ryberg M. und Sundqvist C. (1987):
Transformation of photoinactive to photoactive protochlorophyllide in isolated prolamellar bodies of wheat (*Triticum aestivum*) exposed to low pH and ATP.
Plant Physiol. **70**, 155-162
- Grevby C.**, Engdahl S., Ryberg M. und Sundqvist C. (1989):
Binding properties of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase as revealed by detergent and ion treatments of isolated and immobilized prolamellar bodies.
Pysiol. Plant. **77**, 493-503

Griffiths W.T. (1974):

Protochlorophyll and protochlorophyllide as precursors for chlorophyll synthesis *in vitro*.

FEBS Letters **49** (2), 196-200

Griffiths W.T. (1975):

Characterization of the terminal stages of chlorophyll(ide) synthesis in etioplast membrane preparations.

Biochem. J. **152**, 623-635

Griffiths W.T. (1978):

Reconstitution of chlorophyllide formation by isolated etioplast membranes.

Biochem. J. **174**, 681-692

Griffiths W.T. (1980):

Substrate-specificity studies on protochlorophyllide reductase in barley (*Hordeum vulgare*) etioplast membranes.

Biochem. J. **186**, 267-278

Griffiths W.T. und Oliver R.P. (1984):

Protochlorophyllide reductase - structure, function and regulation. in „Chloroplast biogenesis“.

(Ed. Ellis R.J.), 245-258 (Cambridge University Press)

Griffiths W.T. (1991):

Protochlorophyllide photoreduction.

in „Chlorophylls“.

(Ed. Scheer H.), 433-449 (CRC Press, Boca Raton)

Griffiths W.T., McHugh T. und Blankenship R.E. (1996):

The light intensity dependence of protochlorophyllide photoconversion and its significance to the catalytic mechanism of protochlorophyllide reductase.

FEBS Letters **398**, 235-238

Helfrich M. und Rüdiger W. (1992):

Various metallophorbides as substrates for chlorophyll synthase.

Z. Naturforsch. **47c**, 231-238

Helfrich M., Schoch S., Lempert U., Cmiel E. und Rüdiger W. (1994):

Chlorophyll synthetase cannot synthesize chlorophyll *a'*.

Eur. J. Biochem. **219**, 267-275

Helfrich M., Schoch S., Schäfer W., Ryberg M. und Rüdiger W. (1996):

Absolute configuration of protochlorophyllide *a* and substrate specificity of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase.

J. Am. Chem. Soc. **118**, 2606-2611

- Helfrich M.**, Ross A., King G.C., Turner A.G und Larkum A.W.D. (1999):
Identification of [8-vinyl]-protochlorophyllide *a* in phototrophic prokaryotes and algae:
chemical and spectroscopic properties.
Biochim. Biophys. Acta **1410**, 262-272
- Henningsen K.W.** und Boynton J.E. (1970):
Macromolecular physiology of plastids. VIII. Pigment and membrane formation in
plastids of barley greening under low light intensity.
J. Cell Biol. **44**, 290-304
- Henningsen K.W.** und Kahn A. (1971):
Photoactive subunits of protochlorophyll(ide) holochrome.
Plant Physiol. **47**, 685-690
- Henningsen K.W.** und Thorne S.W. (1974):
Esterification and spectral shifts of chlorophyll(ide) in wildtype and mutant seedlings
developed in darkness.
Physiol. Plant. **30**, 82-89
- Henningsen K.W.**, Thorne S.W. und Boardman N.K. (1974):
Properties of protochlorophyllide and chlorophyll(ide) holochromes from etiolated and
greening leaves.
Plant Physiol. **53**, 419-425
- Heukeshoven J.** und Dernick R. (1985):
Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the
mechanism of silver staining.
Electrophoresis **6**, 103-112
- Holt A. S.** und Morley H.V. (1959):
A proposed structure for Chlorophyll *d*.
Can. J. Chem. **37**, 507-514
- Holtorf H.**, Reinbothe S., Reinbothe C., Bereza B. und Apel K. (1995):
Two routes of chlorophyllide synthesis that are differentially regulated by light in barley
(*Hordeum vulgare* L.).
Proc. Natl. Acad. Sci. **92**, 3254-3258
- Holtorf H.** und Apel K. (1996):
The regulation of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductases A and B in green barley
plants kept under a diurnal light/dark cycle.
Planta **199**, 289-295
- Houen G.**, Gough S.P. und Kannangara C.G. (1983):
 δ -Aminolevulinate synthesis in greening barley.
V. The structure of glutamate-1-semialdehyde.
Carlsberg Res. Commun. **48**, 567-572

- Houssier C.** und Sauer K. (1969):
Optical properties of the protochlorophyll pigments. II. Electronic absorption, fluorescence and circular dichroism spectra.
Biochim. Biophys. Acta **172**, 492-502
- Huang L.**, Bonner B.A. und Castelfranco P.A. (1989):
Regulation of 5-aminolevulinic acid synthesis in developing plastids. II. Regulation of ALA-synthesizing capacity by phytochrome.
Plant Physiol. **90**, 1003-1008
- Ikeuchi M.** und Murakami S. (1982):
Measurement and identification of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase solubilized with Triton-X-100 from etioplast membranes of squash etioplasts.
Plant Cell Physiol. **23**, 1089-1099
- Ikeuchi M.** und Murakami S. (1983):
Separation and characterization of prolamellar bodies and prothylakoids from squash etioplasts.
Plant Cell Physiol. **24** (1), 71-80
- Israelachvili J.N.**, Marcelja S. und Horn R.G. (1980):
Physical principles of membrane organization.
Q. Rev. Biophys. **13**, 121-200
- Jacobs J.M.** und Jacobs N.J. (1984):
Protoporphyrinogen oxidase, an enzymatic step in heme and chlorophyll synthesis: partial characterization of the reaction in plant organelles and comparison with mammalian and bacterial systems.
Arch. Biochem. Biophys. **229**, 312-319
- Jahn D.** (1992):
Complex formation between glutamyl-tRNA synthetase and glutamyl-tRNA reductase during tRNA-dependent synthesis of 5-aminolevulinic acid in *Chlamydomonas*.
FEBS Lett. **314**, 77-80
- Jeffrey S.W.** (1972):
Preparation and some properties of crystalline chlorophyll c1 and c2 from marine algae.
Biochim. Biophys. Acta **279**, 15-33
- Jones I.D.**, White R.C., Gibbs E. und Butler L.S. (1977):
Estimation of zinc pheophytins, chlorophylls, and pheophytins in mixtures in diethylether or 80% acetone by spectrometry and fluorometry.
J. Agric. Food Chem. **25**, 146-149
- Jörnval H.**, Persson B., Krook M., Atrian S., Gonzalez-Duarte R., Jeffery J. und Ghosh D. (1995):
Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR).
Biochemistry **34**, 6003-6013

Jordan P.M. (1991):

The biosynthesis of 5-aminolaevulinic acid and its transformation into uroporphyrinogen III.

in „Biosynthesis of tetrapyrroles“.

(Ed. Jordan P.M.), 1-66 (Elsevier, Amsterdam)

Jordan P.M. (1994):

The biosynthesis of uroporphyrinogen III: mechanism of action of porphobilinogen deaminase.

in „The biosynthesis of tetrapyrrole pigments“.

(Eds. Chadwick D.J. und Ackril, K.) Ciba Symposium **180**, 70-96 (John Wiley and Sons, Chichester)

Kahn A., Boardman N.K. und Thorne S.W. (1970):

Energy transfer between protochlorophyllide molecules: evidence for multiple chromophores in the photoactive protochlorophyllide-protein complex *in vivo* and *in vitro*.

J. Mol. Biol. **48** (1), 85-101

Kahn A. (1983):

Spectrophotometric quantitation of protochlorophyll(ide): Specific absorption and molar extinction coefficients reconsidered.

Physiol. Plant. **59**, 99-102

Kannangara C.G., Gough S.P. (1978):

Biosynthesis of δ -aminolevulinic acid in greening barley leaves: glutamate 1-semialdehyde aminotransferase.

Carlsberg Res. Commun. **43**, 185-194

Kannangara C.G., Gough S.P., Oliver R.P. und Rasmussen S.K. (1984):

Biosynthesis of δ -aminolevulinic acid in greening barley leaves. VI. Activation of glutamate by ligation to RNA.

Carlsberg Res. Commun. **49**, 417-437

Kesselmeier J. und Budzikiewicz H. (1979):

Identification of saponins as structural building units in isolated prolamellar bodies from etioplasts of *Avena sativa* L.

Z. Pflanzenphysiol. **91**, 333-344

Kesselmeier J. (1982):

Steroidal saponins in etiolated, greening and green leaves and in isolated etioplasts and chloroplasts of *Avena sativa* L.

Protoplasma **112**, 127-132

Khyse-Andersen J. (1984):

Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.

J. Biochem. Biophys. Methods **10** (3-4), 203-209

- Kikuchi G.**, Kumar A., Talmage P. und Shemin D. (1958):
The enzymatic synthesis of δ -aminolevulinic acid.
J. Biol. Chem. **233**, 1214-1219
- Klein S.** und Schiff J.A. (1972):
The correlated appearance of prolamellar bodies, protochlorophyll(ide) species, and the shibata shift during development of bean etioplasts in the dark.
Plant Physiol. **49**, 619-626.
- Klement H.**, Oster U. und Rüdiger W. (2000):
The influence of glycerol and chloroplast lipids on the spectral shifts of pigments associated with NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase from *Avena sativa* L.
FEBS Lett. **480**, 306-310
- Krasnovskii A.A.** und Kosobutskaya L.M. (1952):
Spectral investigation of chlorophyll during its formation in plants and in colloidal material from etiolated leaves.
Dokl. Akad. Nauk SSSR **85**, 177-180
- Labesse G.**, Vidat-Cors A., Chomilier J., Gaudry M., Momon J.P. (1994):
Structural comparisons lead to the definition of a new superfamily of NAD(P)(H)-accepting oxidoreductases: the single-domain reductases/epimerases/dehydrogenases (the „RED“ family).
Biochem. J. **304**, 95-99
- Landau E.M.** und Rosenbusch J.P. (1996):
Lipidic cubic phases: A novel concept for the crystallization of membrane proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. **93**, 14532-14535
- Lebedev N.** und Timko M.P. (1998):
Protochlorophyllide photoreduction.
Photosynth. Res. **58**, 5-23
- Lebedev N.** und Timko M.P. (1999):
Protochlorophyllide oxidoreductase B-catalyzed protochlorophyllide photoreduction *in vitro*: Insight into the mechanism of chlorophyll formation in light-adapted plants.
Proc. Natl. Acad. Sci. **96**, 9954-9959
- Leeper F.J.** (1994):
The evidence for a spirocyclic intermediate in the formation of uroporphyrinogen III by cosynthase.
in „The biosynthesis of tetrapyrrole pigments“.
(Eds. Chadwick D.J. und Ackril, K.) Ciba Symposium **180**, 111-130 (John Wiley and Sons, Chichester)
- Lindblom G.** und Rilfors L. (1989):
Cubic phases and isotropic structures formed by membrane lipids - Possible biological relevance.
Biochim. Biophys. Acta **988**, 221-256

- Lindsten A.**, Ryberg M. und Sundqvist C. (1988):
The polypeptide composition of highly purified prolamellar bodies and prothylakoids from wheat (*Triticum aestivum*) as revealed by silver staining.
Pysiol. Plant. **72**, 167-176
- Lütz C.** und Klein S. (1979):
Biochemical and cytological observations on chloroplast development VI. Chlorophylls and saponins in prolamellar bodies and prothylakoids seperated from etioplasts of etiolated *Avena sativa* leaves.
Z. Pflanzenphysiol. **95**, 227-237
- Mackinney G.** (1941):
Absorption of light by chlorophyll solutions.
J. Biol. Chem. **140**, 315-322
- Mapleston R.E.** (1978):
Ph.D. Thesis, University of Bristol.
- Martin G.E.**, Timko M.P. und Wilks H.M. (1997):
Purification and kinetic analysis of pea (*Pisum sativum* L.)
NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase expressed as a fusion with maltose-binding protein in *Escherichia coli*.
Biochem. J. **325**, 139-145
- Masuda T.**, Ohta H., Shioi Y. und Takamiya K.I. (1996):
Light regulation of 5-aminolevulinic acid-synthesis system in *Cucumis sativus*: light stimulates activity of glutamyl-tRNA reductase during greening.
Plant Physiol. Biochem. **34**, 11-16
- Matringe M.**, Camadro J.-M., Joyard J. und Douce R. (1994):
Localization of ferrochelatae activity within mature pea chloroplasts.
J. Biol. Chem. **269**, 15010-15015
- Minkov I.N.**, Ryberg M. und Sundqvist C. (1988):
Properties of reformed prolamellar bodies from illuminated and redarkened etiolated wheat plants.
Pysiol. Plant. **72**, 725-732
- Miyashita H.**, Adachi K., Kurano N., Ikemoto H., Chihara M. und Miyachi S. (1997):
Pigment composition of a novel oxygenic photosynthetic prokaryote containing chlorophyll *d* as the major chlorophyll.
Plant Cell Physiol. **38**, 274-281
- Mullet J.E.** (1988):
Chloroplast development and gene expression.
Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **39**, 475-502

- Murray A.E.** und Klein A.O. (1971):
Relationship between photoconvertible and nonphotoconvertible protochlorophyllides.
Physiol. Plant. **48**, 383-388
- Nasrulhaq-Boyce A.**, Griffiths W.T. und Jones O.T.G. (1987):
The use of continuous assays to characterize the oxidative cyclase that synthesizes the
chlorophyll isocyclic ring.
Biochem. J. **243**, 23-29
- McNellis T.W.** und Deng X.W. (1995):
Light control of seedling morphogenetic pattern.
Plant Cell **7**, 1749-17961
- Oliver R.P.** und Griffiths W.T. (1982):
Pigment-protein complexes of illuminated etiolated leaves.
Plant Physiol. **70**, 1019-1025
- Oosawa N.**, Masuda T., Awai K., Fusada N., Shimada H., Ohta H. und Takamiya K. (2000):
Identification and light-induced expression of a novel gene of
NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase isoform in *Arabidopsis thaliana*.
FEBS Lett. **474**, 133-136
- Pebay-Peroula E.**, Rummel E., Rosenbusch J.P. und Landau E.M. (1997):
High resolution X-ray structure of bacteriorhodopsin from microcrystals grown in
lipidic cubic phases.
Science **277**, 1676-1680
- Pontoppidan B.** und Kannangara C.G. (1994):
Purification and partial characterization of barley glutamyl-tRNA^{Glu} reductase, the
enzyme that directs glutamate to chlorophyll biosynthesis.
Eur. J. Biochem. **225**, 529-537
- Porra R. J.** (1991):
Recent advances and re-assessments in chlorophyll extraction and assay procedures for
terrestrial, aquatic, and marine organisms, including recalcitrant algae.
in „Chlorophylls“.
(Ed. Scheer, H.), 31-59 (CRC Press, Boca Raton)
- Porra R.J.** (1997):
Recent progress in porphyrin and chlorophyll biosynthesis.
Photochem. Photobiol. **65**, 492-516
- Rebeiz C.A.**, Wu S.M., Kuhadja M., Daniell H. und Perkins E.J. (1983):
Chlorophyll *a* biosynthetic routes and chlorophyll *a* chemical heterogeneity in plants.
Mol. Cell. Biochem. **57**, 97-125

- Rebeiz C.A.**, Ioannides I.M., Kolossov V. und Kopetz K.J. (1999):
Chloroplast biogenesis 80. Proposal of a unified multibranched chlorophyll *a/b* biosynthetic pathway.
Photosynthetica **36**, 117-128
- Redlinger T.E.** und Apel K. (1980):
The effect of light on four protochlorophyllide-binding polypeptides of barley (*Hordeum vulgare*).
Arch. Biochem. Biophys. **200** (1), 253-260
- Reinbothe S.**, Reinbothe C., Holtorf H. und Apel K. (1995 a):
Two NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases in barley: Evidence for the selective disappearance of PORA during the light-induced greening of etiolated seedlings.
Plant Cell **7**, 1933-1940
- Reinbothe S.**, Reinbothe C., Runge S. und Apel K. (1995 b):
Enzymatic product formation impairs both the chloroplast receptor-binding function as well as translocation competence of the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase, a nuclear-encoded plastid precursor protein.
J. Cell Biology **129**, 299-308
- Reinbothe S.**, Runge S., Reinbothe C., van Cleve B. und Apel K. (1995 c):
Substrate-dependent transport of the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase into isolated plastids.
Plant Cell **7**, 161-172
- Reinbothe S.** und Reinbothe C. (1996):
The regulation of enzymes involved in chlorophyll biosynthesis.
Eur. J. Biochem. **237**, 323-343
- Reinbothe C.**, Lebedev N. und Reinbothe S. (1999):
A protochlorophyllide light-harvesting complex involved in de-etiolation of higher plants.
Nature **397**, 80-84
- Richards W.R.**, Fung M., Wessler A.N. und Hinchingeri S.B. (1987):
Purification and properties of three latter-stage enzymes of chlorophyll synthesis. in „Progress in Photosynthesis Research“.
(Ed. Biggens, J.) **Vol. IV.**, 475-482 (Martinus Nijhoff, Dordrecht)
- Richards W.R.**, Walker C.J. und Griffiths W.T. (1987):
The affinity chromatographic purification of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase from etiolated wheat.
Photosynthetica **21** (4), 462-471

- Rilfors L.**, Lindblom G., Wieslander A. und Christiansson A. (1984):
Lipid bilayer stability in biological membranes.
in „Membrane Fluidity“.
(Eds. Kates M. und Manson L.A.), 205-245 (Plenum, New York)
- Röper U.**, Prinz H. und Lütz C. (1987):
Amino acid composition of the enzyme NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase.
Plant Sci. **52**, 15-19
- Ryberg M.** und Sundqvist C. (1982a):
Characterization of prolamellar bodies and prothylakoids fractionated from wheat etioplasts.
Pysiol. Plant. **56**, 125-132
- Ryberg M.** und Sundqvist C. (1982b):
Spectral forms of protochlorophyllide in prolamellar bodies and prothylakoids fractionated from wheat etioplasts.
Pysiol. Plant. **56**, 133-138
- Ryberg M.**, Sandelius A.S. und Selstam E. (1983):
Lipid composition of prolamellar bodies and prothylakoids of wheat etioplasts.
Pysiol. Plant. **57**, 555-560
- Ryberg M.** und Dehesh K. (1986):
Localization of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase in dark-grown wheat (*Triticum aestivum*) by immuno-electron microscopy before and after transformation of the prolamellar bodies.
Pysiol. Plant. **66**, 616-624
- Ryberg M.** und Sundqvist C. (1991):
Structural and functional significance of pigment-protein complexes of chlorophyll precursors.
in „Chlorophylls“.
(Ed. Scheer H.), 587-612 (CRC Press, Boca Raton)
- Rüdiger W.**, Benz J. und Guthoff C. (1980):
Detection and partial characterization of activity of chlorophyll synthetase in etioplast membranes.
Eur. J. Biochem. **109**, 193-200
- Rüdiger W.** (1987):
Chlorophyll synthetase and its implication for regulation of chlorophyll biosynthesis.
in „Progress in photosynthesis research“.
(Ed. Biggins J.) Vol **IV**, 461-467 (Martinus Nijhoff, Boston)
- Rüdiger W.** und Schoch S. (1988):
Chlorophylls.
in „Plant Pigments“.
(Ed. Scheer H.), 1-59 (Academic Press, London)

- De Santis-Maciossek G.**, Kofer W., Bock A., Schoch S., Maier R.M., Wanner G., Rüdiger W., Koop H.-U. und Herrmann R.G. (1999):
Targeted disruption of the plastid RNA polymerase genes *rpoA*, *B* and *C1*: molecular biology, biochemistry and ultrastructure.
Plant J. **18**, 477-489
- Scheumann V.**, Helfrich M., Schoch S. und Rüdiger W. (1996):
Reduction of the formyl group of zinc pheide *b* *in vitro* and *in vivo* : a model for the chlorophyll *b* to *a* transformation.
Z. Naturforsch. **51c**, 185-194
- Scheumann V.**, Klement H., Helfrich M., Oster U., Schoch S. und Rüdiger W. (1999):
Protochlorophyllide *b* does not occur in barley etioplasts.
FEBS Letters **445** (2), 445-448
- Schoch S.**, Lempert U. und Rüdiger W. (1977):
Über die letzten Stufen der Chlorophyll-Biosynthese Zwischenprodukte zwischen Chlorophyllid und phytolhaltigem Chlorophyll.
Z. Pflanzenphysiol. **83**, 427-436
- Schoch S.** (1978):
The esterification of chlorophyllide *a* in greening bean leaves.
Z. Naturforsch. **33c**, 712-714
- Schoch S.**, Helfrich M., Wiktorsson B., Sundquist C., Rüdiger W. und Ryberg M. (1995):
Photoreduction of zinc protoporphorbide *b* with NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase from etiolated wheat (*Triticum aestivum* L.).
Eur. J. Biochem. **229**, 291-298
- Schopfer P.** und Siegelman H.W. (1968):
Purification of protochlorophyllide holochrome.
Plant Physiol. **43**, 990-996
- Selstam E.** und Widell Wigge A. (1989):
Hydrophobicity of protochlorophyllide oxidoreductase, characterized by means of Triton X-114 partitioning of isolated etioplast membrane fractions.
Physiol. Plant. **77**, 401-406
- Selstam E.**, Brentel I. und Lindblom G. (1990):
Phase structure of lipids of the photosynthetic membrane.
in „Plant lipid Biochemistry, Structure and Utilization“.
(Eds. Quinn P.J. und Harwood J.L.) 39-46 (Portland Press, London)
- Selstam E.** und Widell-Wigge A. (1993):
Chloroplast lipids and the assembly of membranes.
in „Pigment-protein complexes in plastids“.
(Eds. Sundqvist C. und Ryberg M.), 241-277 (Acad.Press, San Diego)

Shibata K. (1957):

Spectroscopic studies on chlorophyll formation in intact leaves.
J. Biochem. **44**, 147-173

Shiple G.G., Green J.P. und Nichols B.W. (1973):

The phase behaviour of monogalactosyl, digalactosyl, and sulphoquinovosyl diglycerides.
Biochim. Biophys. Acta **311**, 531-544

Shioi Y. und Beale S. I. (1987):

Polyethylene-based high-performance liquid chromatography of chloroplast pigments: resolution of mono- and divinyl chlorophyllides and other pigment mixtures.
Anal. Biochem. **162**, 493-499

Sironval C. und Kuyper Y. (1972):

The reduction of protochlorophyllide into chlorophyllide. IV. The nature of the intermediate P688-676 species.
Photosynthetica **6** (3), 254-275

Smith J.H.C. und Ahrne I.M. (1955):

The holochromes of etiolated tissues.
Carnegie Inst. Wash. Year B. **54**, 157-159

Smith J.H.C. und Kupke D.W. (1956):

Some properties of extracted protochlorophyll holochrome.
Nature **178**, 751-752

Smith J. R. L. und Calvin M. (1966):

Studies on the chemical and photochemical oxidation of bacteriochlorophyll.
J. Amer. Chem. Soc. **88**, 4500-4506

Soll J., Schultz G., Rüdiger W. und Benz J. (1983):

Hydrogenation of geranylgeraniol. Two pathways exist in spinach chloroplasts.
Plant. Physiol. **71**, 849-854

Spano A.J., He Z., Michel H., Hunt D.F. und Timko M.P. (1992a):

Molecular cloning, nuclear gene structure, and developmental expression of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase in pea (*Pisum sativum* L.).
Plant Mol. Biol. **18**, 967-972

Spano A.J., He Z. und Timko M.P. (1992b):

NADPH: protochlorophyllide oxidoreductases in white pine (*Pinus strobus*) and loblolly pine (*P. taeda*). Evidence for light and developmental regulation of expression and conservation in gene organization and protein structure between angiosperms and gymnos.
Mol. Gen. Genet. **236**, 86-95

Spencer P. und Jordan P.M. (1994):

Investigation of the nature of the two metal-binding sites in 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*.
Biochem. J. **300**, 373-381

Sperling U., Franck F., van Cleve B., Frick G., Apel K. und Armstrong G.A. (1998):

Etioplast differentiation in Arabidopsis: Both PORA and PORB restore the prolamellar body and photoactive Protochlorophyllide-F655 to the *cop1* photomorphogenetic mutant.
Plant Cell **10**, 283-296

Sprague S.G. und Staehelin L.A. (1987):

Isolation and reconstitution of thylakoid lipids.
Methods in Enzymology **148**, 319-327

Stobart A.K. und Ameen-Bukhari I. (1986):

Photoreduction of protochlorophyllide and its relationship to δ -aminolaevulinic acid synthesis in the leaves of dark-grown barley (*Hordeum vulgare*) seedlings.
Biochem. J. **236**, 741-748

Stubbs G.W., Smith H.G. Jr. und Litman B.J. (1976):

Alkyl glucosides as effective solubilizing agents for bovine rhodopsin: A comparison with several commonly used detergents.
Biochim. Biophys. Acta **425**, 46-56

Suzuki J.Y. und Bauer C.E. (1995):

A prokaryotic origin for light-dependent chlorophyll biosynthesis of plants.
Proc. Natl. Acad. Sci. **92**, 3749-3753

Suzuki J.Y., Bollivar D.W. und Bauer C.E. (1997):

Genetic analysis of chlorophyll biosynthesis.
Annu. Rev. Gen. **31**, 61-89

Teakle G.R. und Griffiths W.T. (1993):

Cloning, characterization and import studies on protochlorophyllide reductase from wheat (*Triticum aestivum*).
Biochem. J. **296**, 225-230

Timko M.P. (1998):

Pigment biosynthesis: Chlorophylls, heme, and carotinoides.
in „Molecular biology of Chlamydomonas: Chloroplasts and mitochondria“.
(Eds. Rochaix J.D., Goldschmidt-Clermont M. und Merchant S.), (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht)

Townley H.E., Griffiths W.T. und Nugent J.P. (1998):

A reappraisal of the mechanism of the photoenzyme protochlorophyllide reductase based on studies with the heterologously expressed protein.
FEBS Letters **422**, 19-22

- Urbig T.**, Knaust R.K.C., Schiller H. und Senger H. (1995b):
Kinetic studies of protochlorophyllide reduction *in vitro* in the greening mutant C-2A` of the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus*.
Z. Naturforsch. **50** c, 775-780
- Urbig T.**, Schiller H. und Senger H. (1995a):
Solubilization and hydrophobicity test by Triton-X-114-partitioning of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase from the unicellular alga *Scenedesmus obliquus*, mutant C-2A`.
Pysiol. Plant. **95**, 141-146
- Valera V.**, Fung M., Wessler A.N. und Richards W.R. (1987):
Synthesis of 4R- and 4S-tritium labeled NADPH for the determination of the coenzyme stereospecificity of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **148**, 515-520
- Virgin H.I.** und French C.S. (1973):
The light induced protochlorophyll-chlorophyll *a*-transformation and the succeeding interconversions of the different forms of chlorophyll.
Pysiol. Plant. **28**, 350-357
- Virgin H.I.** (1993):
Effectiveness of light of different wavelengths to induce chlorophyll biosynthesis in rapidly and slowly greening tissues.
Physiol. Plant. **89**, 761-766
- Warren M.J.**, Bolt E. und Woodcock S.C. (1994):
5-Aminolaevulinic acid and uroporphyrinogen methylase: two key control enzymes of tetrapyrrole biosynthesis and modification.
in „The biosynthesis of tetrapyrrole pigments“.
(Eds. Chadwick D.J. und Ackrill K.) Ciba Symposium **180**, 26-40 (John Wiley and Sons, Chichester)
- Wasielewski M. R.** und Thompson J.F. (1978):
9-Desoxo-9,10-dehydrochlorophyll *a* - A new chlorophyll with an effective 20- π electron macrocycle.
Tetrahedron Lett. **12**, 1043-1046
- Wellburn F.A.M.**, Wellburn A.R. und Senger H. (1980):
Changes in ultrastructure and photosynthetic capacity within *Scenedesmus obliquus* mutants C-2A`, C-6D, and C-6E on transfer from dark grown to illuminated conditions.
Protoplasma **103**, 35-54
- Whyte B.J.** und Griffiths W.T. (1993):
8-vinyl reduction and chlorophyll *a* biosynthesis in higher plants.
Biochem. J. **291**, 939-944

Whyte B.J. und Castelfranco P.A. (1993):

Further observations on the Mg-protoporphyrin IX monomethylester (oxidative) cyclase system.

Biochem. J. **290**, 355-359

Widell Wigge A. und Seltstam E. (1990):

Effects of salt wash on the structure of the prolamellar body membrane and the membrane binding of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase.

Physiol. Plant. **78**, 315-323

Wiktorsson B., Ryberg M. und Sundqvist C. (1996):

Aggregation of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase-pigment complexes is favoured by protein phosphorylation.

Plant Physiol. Biochem. **34**, 23-34

Wiktorsson B., Ryberg M., Gough S. und Sundqvist C. (1992):

Isoelectric focusing of pigment-protein complexes solubilized from non.irradiated and irradiated prolamellar bodies.

Physiol. Plant. **85**, 659-669

Wilks H.M. und Timko M.P. (1995):

A light-dependent complementation system for analysis of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase. Identification and mutagenesis of two conserved residues that are essential for enzyme activity.

Proc. Natl. Acad. Sci. **92**, 724-728

Williams W.P., Selstam E. und Brain T. (1998):

X-ray diffraction studies of the structural organisation of prolamellar bodies isolated from *zea mays*.

FEBS Letters **422**, 252-254

Wolf H. und Scheer H. (1971):

Bestimmung der absoluten Konfiguration diastereomerer 9-Desoxo-9(R.S)-hydroxy-10(R.S)-methylphäophorbide der a-Reihe.

Liebigs Ann. Chem. **745**, 87-98

Yee W.C., Eglsaer S.J. und Richards W.R. (1989):

Confirmation of a ping-pong mechanism for *S*-adenosyl-L-methionine:

Mg protoporphyrin IX methyltransferase of etiolated wheat by an exchange mechanism.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **162**, 483-490

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Harald Klement
Geburtsdatum/-ort: 05.03.1966 in München
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1972 - 1976 Grundschule an der Königswieser Str., München.
1976 - 1983 Gymnasium Fürstenried-West, München.
1983 - 1984 Bundesoberstufenrealgymnasium, Innsbruck (A);
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife.

Hochschulausbildung

1984 - 1988 Studium der Humanmedizin
an der Universität Innsbruck (A).
1989 - 1995 Studium der Lebensmittelchemie
an der Ludwig-Maximilians-Universität München.
Abschluß: 1. Staatsprüfung.

Berufstätigkeit

Februar 1996 Beginn der Dissertation am Botanischen Institut der
Ludwig-Maximilians-Universität München,
Lehrstuhl für Phytochemie, unter der Leitung von
Prof. Dr. Dr. h.c. W.Rüdiger.
Feb. 2000 - Jul. 2000 Praktische Ausbildung zum Lebensmittelchemiker
am Landesuntersuchungsamt für das
Gesundheitswesen Südbayern, Oberschleißheim.
Abschluß: 2. Staatsprüfung

