

**Untersuchungen zur Anpassung des
Photosyntheseapparates Höherer Pflanzen bei Wachstum
unter einem erhöhtem CO₂-Partialdruck von 700 ppm**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Karsten Alfermann

angefertigt an der Fakultät für Biologie
der Universität Bielefeld

unter der Anleitung von
Herrn Prof. Dr. G.H. Schmid

Bielefeld, im Oktober 2001

Ich danke Herrn Prof. Dr. G.H. Schmid für die interessante Aufgabenstellung, die hervorragende Betreuung während meiner wissenschaftlichen Arbeit, für die sehr gute Betreuung während der schriftlichen Fertigstellung meiner Dissertation und für die finanzielle Unterstützung.

Herrn Dr. A. Radunz danke ich für seine Tips und Hilfestellungen, sowie für die Bereitstellung der Antiseren für die immunologischen Arbeiten.

Ich möchte mich auch bei allen Mitgliedern des Lehrstuhls bedanken, die mir mit Rat zur Seite gestanden haben.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

1.1 Die Photosynthese	1
1.2 Die erdgeschichtliche Entwicklung der terristischen Flora.	4
1.3 Die erdgeschichtliche Klimaentwicklung seit dem Beginn der Besiedlung der Landmassen durch die Pflanzen unter der Berücksichtigung der atmosphärischen CO ₂ -Konzentration.	8
1.4 Die Anpassungserscheinungen Höherer Pflanzen vom C ₃ -Typ auf eine erhöhte CO ₂ -Atmosphäre.	13
1.5 Anpassungserscheinungen der Lichtreaktion der Photosynthese von C ₃ -Pflanzen bei Wachstum unter einer erhöhten CO ₂ - Atmosphäre von 700 ppm.	18
1.6 Forschungsansatz	19
1.7 Aufgabenstellung	22

II. Material und Methode

2.1 Versuchsobjekte	24
2.2 Anzuchtbedingungen	25
2.3 Chlorophyll- & Carotinoidbestimmung	25
2.4 Isolierung des Versuchsmaterials	
2.4.1 Isolierung von photosynthetisch aktiven Chloroplasten	27
2.4.2 Isolierung von Thylakoidmembranen	28
2.4.3 Isolierung von Photosystem II Membranen	29
2.4.4 Photosystem I Präparation	30
2.5 Proteinbestimmung	
2.5.1 Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure	32
2.5.2 Proteinbestimmung mit Neßler's Reagenz	32
2.6 Wachstumskurve	33
2.7 Lipidanalyse der Thylakoidmembranen	
2.7.1 Isolierung der Lipide	33
2.7.2 Test auf die Reinheit der isolierten Thylakoidmembranen: Ausschluß der Kontaminierung der Lipidfraktion durch Phosphatidylethanolamin.	34
2.7.3 Quantitative Plastochinon-Bestimmung mit High Pressure Liquid Chromatography (HPLC).	35
2.7.4 Isolierung von Carotinoiden und Fettsäuren aus dem Gesamtlipidextrakt	36

2.7.5 Isolierung der Carotinoide aus Blattmaterial	37
2.7.6 Gaschromatographische Analyse der Fettsäuren	38
2.7.7 HPLC-Analyse der isolierten Carotinoide	38
2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
2.8.1 Herstellung des SDS-Polyacrylamid-Gel	39
2.8.2 Proben & Probenvorbereitung	41
2.8.3 Elektrophoresebedingung	42
2.9 Silberfärbung der SDS-Polyacrylamidgele (Silverstain)	42
2.10 Westernblot	43
2.11 Antiseren	45
2.12 Messung der photosynthetischen Aktivität	
2.12.1 Warburg-Manometrie	46
2.12.2 Clark-Sauerstoff-Elektrode	46
2.12.2.a Einfluß der Lichtintensität auf die Hill- und Mehlerreaktion, sowie auf die PS I-Aktivität.	50
2.12.2.b Abhängigkeit der PS I-Aktivität von der Konzentration des Elektronendonors Dichlorphenolindophenol (DCPIP) im Reaktionsansatz.	50
2.12.2.c Einfluß der Temperatur auf die Hill- und Mehlerreaktion, sowie auf die PS I-Aktivität.	51
2.13 Blitzlichtspektroskopie (Messung der P700 Absorption)	51
2.14 Bestimmung des Chlorophyll / P700-Verhältnisses isolierter PS I-Komplexe	53
2.15 Fluoreszenz	53
2.16 Bestimmung der ATP Konzentration in isolierten Chloroplasten	54
2.17 Berechnung der Standardabweichung vom Mittelwert	55

III. Ergebnisse

3.0 Pflanzenmaterial	56
3.1 Blattflächenwachstum	57
3.3 Die Auswirkung des erhöhten CO ₂ -Angebot auf den Habitus der Blätter	59
3.3 Chlorophyll-, Carotinoid- und Proteinbestimmung	61
3.4 Bestimmung der Carotinoidzusammensetzung in den Blättern der Tabakpflanzen N.t. var. JWB und Aureamutante Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO ₂ -Konzentration (700 ppm)	75

3.5 Carotinoid-, Plastochinon- und Fettsäuren-Bestimmung im Gesamtlipid-extrakt, isolierter Thylakoidmembranen der Tabakpflanzen JWB und Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO ₂ -Konzentration (700 ppm)	
3.5.1 Reinheitstest der isolierten Thylakoid-Lipide auf Phosphatidylethanolamin	80
3.5.2 High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) Analyse der Pigmentverteilung im Gesamtlipidextrakt isolierter Thylakoidmembranen	81
3.5.3 Bestimmung der Plastochinon-Konzentration im Gesamtlipidextrakt isolierter Thylakoidmembranen	85
3.5.4 Qualitative und quantitative Bestimmung der Fettsäuren isolierter Thylakoidmembranen.	89
3.6 Analyse der Polypeptidzusammensetzung isolierter Thylakoidmembranen und PS I-Komplexe mit der Sodiumdodecylsulfat-(SDS) Gelelektrophorese	93
3.7 Analyse der Verteilung bestimmter Polypeptide des Photosyntheseapparates mit Hilfe des Westernblot-Verfahren	100
3.8 Bestimmung des Gehaltes an ATP in isolierten Chloroplasten	108
3.9 Fluoreszenzinduktionskinetik dunkeladaptierter Blätter und Chloroplasten der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO ₂ -Konzentration (700 ppm)	110
3.10 Photosynthetische Aktivität	119
3.10.1 Messung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung von Blattstücken mit der Warburg-Manometrie	119
3.10.2 Messung der photosynthetischen Aktivität von Chloroplasten in der Clark- Sauerstoff-Elektrode	122
3.10.3 Messung des P700-Signals von Chloroplasten durch die P700-Blitzlicht-absorptionsspektroskopie	128
3.10.4 Photosynthetische Aktivität isolierter PS I-Komplexe	131
3.10.5 Einfluß der Konzentration an DCPIP auf die Aktivität der PS I-Reaktion isolierter Chloroplasten und PS I-Komplexe	133
3.10.6 Photosynthetische Aktivität isolierter Chloroplasten, PS II-Membranen und PS I-Komplexe in Abhängigkeit von der Lichtintensität	136
3.10.7 Einfluss der Temperatur auf die photosynthetische Aktivität in Chloroplasten und PS II-Membranen	144

IV. Diskussion

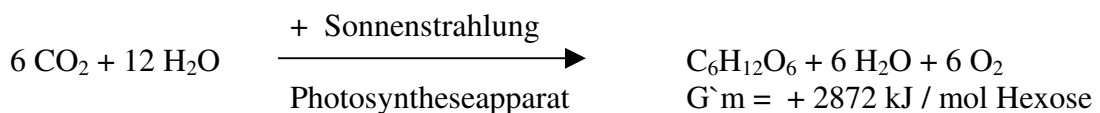
4.1 Pflanzenwachstum und Blatthabitus	149
---------------------------------------	-----

4.2 Pigment- und Proteinbestimmung	149
4.3 Carotinoidzusammensetzung	153
4.4 Bestimmung der Plastochinon-Konzentration	155
4.5 Analyse der Polypeptidzusammensetzung	156
4.6 Westernblot-Analyse	157
4.7 ATP-Gehalt	162
4.8 Die physiologischen Untersuchungen	162
4.9 Modellvorstellung zur Veränderungen im Photosyntheseapparat bei Wachstum unter erhöhtem CO ₂	166
4.10 Schlußfolgerung	170
V. Zusammenfassung	172
VI. Abkürzungsverzeichnis	174
VII. Literaturverzeichnis	176

1 Einleitung

1.1 Die Photosynthese.

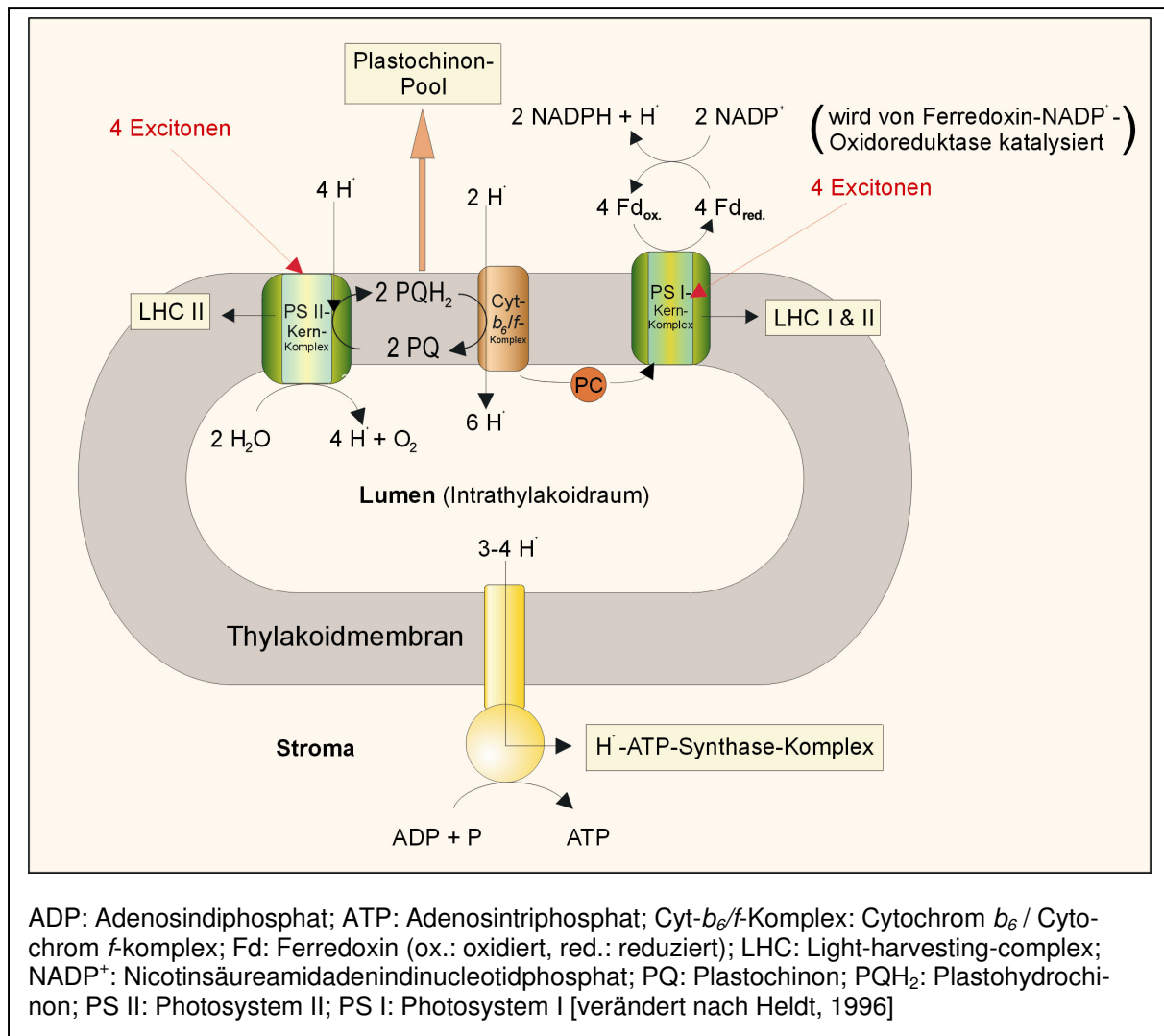
Photosynthese ist die Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie. Pflanzen, Algen, grüne Flagellaten und die prokaryotischen photosynthetisierenden Organismen (Cyanobakterien) absorbieren das sichtbare Licht der Sonne und bilden mit Hilfe der aufgenommenen Lichtenergie und anorganischen Verbindungen ihre eigene organische Zellsubstanz. Sie werden daher auch als *photoautotrophe Organismen* bezeichnet. Die Photosynthese wird allgemein in zwei große Reaktionsabläufe unterteilt: die Lichtreaktion und die Dunkelreaktion. Bei der Lichtreaktion wird unter Ausnutzung der aufgenommenen Lichtenergie Wasser (H₂O) in Sauerstoff und Wasserstoff (genau genommen in Protonen und Elektronen) gespalten. Gleichzeitig entsteht ATP. Der aus der Wasserspaltung entstehende molekulare Sauerstoff (O₂) wird freigesetzt. Daher wird diese Form der Photosynthese auch als *oxygene Photosynthese* bezeichnet. Die aufgenommene Energie des Lichtes wird in Form der chemischen Energie des NADPH + H⁺ (Reduktionsäquivalent) und des ATP (Energieäquivalent) konserviert. In der sogenannten Dunkelreaktion werden die aus der Lichtreaktion erzeugten NADPH + H⁺- und ATP-Moleküle zur Bildung von organischer Substanz, so z.B. zur Synthese von Kohlenhydraten aus CO₂ verbraucht. Die meisten Bakterien, die Pilze, die Tiere und auch der Mensch sind von der Substanzproduktion der photoautotrophen Organismen vollkommen abhängig, da sie nicht in der Lage sind, diese selbst herzustellen. Sie sind also *heterotroph*. Sie gewinnen die für ihre Lebensprozesse erforderliche Energie durch die Oxidation der letztlich durch die photoautotrophen Organismen (hauptsächlich Pflanzen) gebildeten Biomasse [Heldt, H. W., 1996]. Der Gesamtprozeß der Photosynthese bei höheren und niederen Pflanzen, Algen und Cyanobakterien kann folgendermaßen beschrieben werden:



An der Lichtreaktion der Photosynthese sind vier große Multiprotein-Komplexe (Photosystem II, Cytochrom *b₆/f*-Komplex, Photosystem I und der protonen betriebene ATP-Synthase-Komplex) beteiligt, die asymmetrisch in speziellen Membranen eingebettet sind. Diese Membranstrukturen, auch Thylakoidmembranen [Menke, 1961] genannt, liegen bei den Höheren Pflanzen und Algen in den Chloroplasten und bei den Cyanobakterien frei im Cytoplasma vor (die genauere Beschreibung der Struktur des Lamellarsystems in Chloroplasten Höherer Pflanzen siehe Seite 67 folgende). Die folgende Abbildung zeigt eine

schematische Darstellung der Anordnung des Photosyntheseapparates in der Thylakoidmembran Höherer Pflanzen und Grünalgen.

Abbildung 1.0 Schematische Darstellung der Anordnung der vier Multiprotein-Komplexe des Photosyntheseapparates in der Thylakoidmembran.



Die beiden Pigment-bindenden Multiprotein-Komplexe des Photosyntheseapparates in Höheren Pflanzen und Grünalgen sind die beiden Photosysteme I & II. Nur sie sind in der Lage, Lichtenergie zu sammeln und mit dieser Lichtenergie die Ladungstrennung quer durch die Membran zu vollziehen. Sie lassen sich funktionell in zwei Komponenten aufteilen: den **Kern-Komplex** mit dem jeweiligem Reaktionszentrum und dem **Lichtsammel-Antennen-Komplex** (genauere Beschreibung der beiden Photosysteme (Seite 70 folgende und Seite 72 folgende) und deren Verteilung in der Thylakoidmembran Höherer Pflanzen siehe Abb. 3.6 auf Seite 68). Zwischen den beiden Photosystemen (I & II) sind verschiedene Redoxsysteme, sogenannte *Carrier*, angeordnet, die den Elektronenfluß von Photosystem II (PS II) nach Photosystem I (PS I) bewerkstelligen. Das aus der Wasserspaltung stammende Elektron wird von PS II auf Plastochinon übertragen. Durch gleichzeitige Aufnahme von Protonen wird

Plastochinon zu Plastohydrochinon reduziert. Hierfür sind zwei Elektronen und zwei Protonen (H^+) erforderlich. Die Protonen stammen aus der Chloroplastenmatrix, auch Stroma genannt. Die Gesamtheit der Plastochinon-Moleküle in der Thylakoidmembran wird als Plastochinon-Pool bezeichnet. Der bewegliche Plastochinon-Pool gibt die Elektronen und Protonen an den Cytochrom *b₆/f*-Komplex weiter. Der Komplex besteht aus der Cytochrom *f*-Untereinheit (31 kDa), der Cytochrom *b₆*-Untereinheit (24 kDa), der Untereinheit IV (15 kDa), dem Rieske-Protein (19 kDa) und 2 bis 3 kleineren Polypeptiden [Wollman et al., 1999]. Von diesem Membran-Komplex werden die Elektronen auf Plastocyanin, ein 10 kDa großes Kupferprotein vom Typ 1 (es enthält ein einzelnes Kupfer-Atom) übertragen, welches an der luminalen Seite der Thylakoidmembran lokalisiert ist. Das reduzierte Plastocyanin gibt die Elektronen an Photosystem I (PS I) weiter. Durch Aufnahme von Lichtenergie überträgt das PS I Elektronen auf Ferredoxin, ein Nicht-Häm-Eisen-Protein, welches als bewegliches Polypeptid mit einer Molekularmasse von 10,3 kDa an der Stromaseite der Thylakoidmembran agiert. Das reduzierte Ferredoxin überträgt die Elektronen auf die Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase, welche dann die Reduktion des Endakzeptors NADP⁺ zu NADPH+H⁺ bewerkstelligt. Wie die Abb. 1.0 zeigt, kommt es bei dem lichtbetriebenen Elektronenfluß von H₂O nach NADP⁺ zu einer Protonenanreicherung im Lumen (Intrathylakoidraum). Die Akkumulierung der Protonen im Intrathylakoidraum ist einerseits eine Konsequenz der Wasserspaltung am PS II und andererseits in der Translokation von Protonen (H^+) am Cytochrom *b₆/f*-Komplex begründet. Die Protonen stammen zum Einem aus der Oxidation des Plastohydrochinons zu Plastochinon durch den Cytochrom *b₆/f*-Komplex und zum Anderen sorgt ein zusätzlicher Mechanismus in diesem Komplex, der als Q-Zyklus bezeichnet wird, für eine weitere Protoneneinspeisung in das Lumen [Hauska et al., 1996]. Die Ansäuerung des Intrathylakoidraumes durch die Protonen (H^+)-Anreicherung führt zu einem pH-Gradienten (Δ pH) zwischen dem Stroma und dem Lumen (Intrathylakoidraum). Gleichzeitig entsteht dadurch ein Membranpotential (Δ Ψ). Aus diesem elektrochemischen Potential resultiert eine protonenmotorische Kraft (PMK), die zur Synthese von ATP aus ADP und Phosphat (P) genutzt wird. Diese Reaktion wird von einer membranständigen ATP-Synthase katalysiert. Die Synthese von ATP ist also die Konsequenz des lichtbetriebenen Elektronenflusses in der Thylakoidmembran von H₂O nach NADP⁺.

Der in der Abb. 1.0 dargestellte Elektronenfluß über die beiden Photosysteme II & I von H₂O nach NADP⁺ macht es erforderlich, daß die Energie der eingefangenen Photonen auf die beiden Photosysteme gleichmäßig verteilt wird. Unter natürlichen Bedingungen variieren die Lichtverhältnisse in ihrer Intensität und in ihrem Spektrum. Damit der Photosyntheseapparat auf veränderte Lichtbedingungen reagieren kann, bedarf es besonderer Anpassungen (oder Adaptationen). Bei den Höheren Pflanzen findet man die PS II-Komplexe in den Granathylakoiden (gestapelte Membranbereiche) und die PS I-Komplexe in den Stromathylakoiden (nicht-gestapelte Membranbereiche, Abb 3.6 auf Seite 68). Diese räumliche Trennung der beiden Photosysteme verhindert ein unkontrolliertes Überfließen der Excitonen von PS II nach PS I. Damit die Lichtenergie zwischen den beiden Photosystemen

gleichmäßig verteilt wird, verfügen Pflanzen über ein Regulativ. Das zugrundeliegende Prinzip wird auch als Übergang von einem Zustand geringen Energietransfers zwischen Photosystem II und dem Photosystem I (Status 1 (State 1)) zu einem Zustand hohen Energietransfers zwischen beiden Photosystemen (Status 2 (State 2)) verstanden [Richter 1996]. Dabei kommt es zu einer lateralen Verlagerung von bestimmten Anteilen des LHC II durch Ablösung vom PS II und anschließender Anlagerung an PS I. Die Ablösung des LHC II vom PS II-Komplex geschieht durch die Phosphorylierung derselben. Dies wird durch eine LHC II-Kinase katalysiert. Die Aktivierung dieser Kinase erfolgt durch den Cytochrom *b₆f*-Komplex [Allen, 1992]. Das Verhältnis Plastohydrochinon zu Plastochinon scheint dabei die bestimmende Größe für die Aktivierung der LHC II-Kinase durch den Cytochrom *b₆f*-Komplex zu sein, obwohl eine direkte Aktivierung durch den Plastochinon-Pool ausgeschlossen werden kann [Allen, 1992]. Diese Regulation der Energieverteilung zwischen den beiden Photosystemen geschieht innerhalb weniger Sekunden und belegt die hohe strukturelle Dynamik des Photosyntheseapparates.

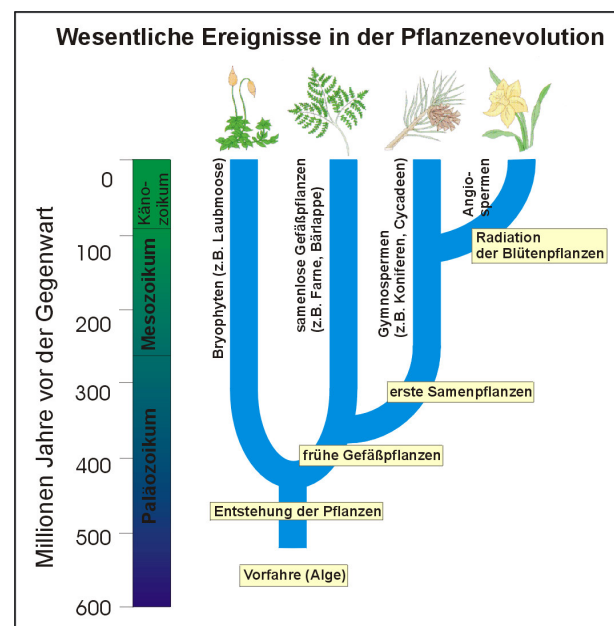
1.2 Die erdgeschichtliche Entwicklung der terristischen Flora.

Vor ca. 460 Millionen Jahren wanderte ein Teil der phototrophen Organismen vom Wasser auf das Land. Damit begann der lange entwicklungsgeschichtliche Weg der komplexeren Organismen auf dem Festland [Campbell, 1997]. Die Abbildung 1.1 zeigt die wesentlichen Ereignisse der Pflanzenevolution.

Als gemeinsamen Vorfahren der Pflanzen werden Grünalgen, im Besonderen Vorfahren der Charophyten in Betracht gezogen, da die rezenten Charophyten viele Homologien zu den heutigen Pflanzen aufweisen [Campbell, 1997]. Der Übergang zum Festland ist sicherlich schrittweise erfolgt. Viele der heute rezenten Charophyten findet man in Flachwasser oder im Uferbereich von Seen. Es ist daher sehr leicht vorstellbar, daß die ursprünglichen Charophyten in der Zeit der Erstbesiedlung in Flachwasserzonen gelebt haben, die zeitweilig trocken waren.

Die vor ca. 460 Millionen Jahre verlaufende Wanderungsbewegung der phototrophen Organismen vom Wasser zum Land ist von einer Vielzahl von morphologischen und physiologischen „Neuerscheinungen“ und Anpassungen begleitet worden, ohne die eine

Abbildung 1.1



[Campbell, 1997, verändert]

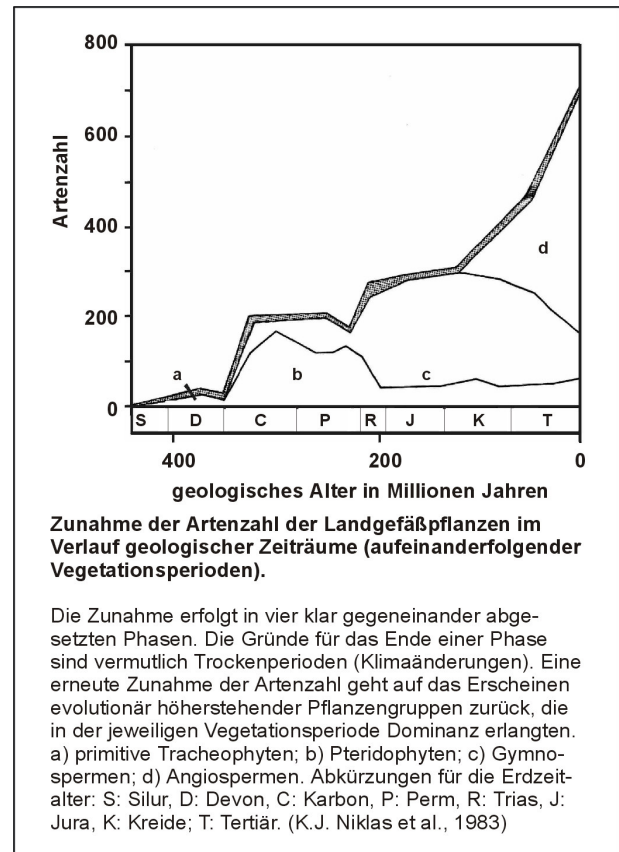
Eroberung der Landmassen durch phototrophe Organismen, letztlich durch die Höheren Pflanzen nicht möglich gewesen wäre.

Die folgende Abbildung 1.2 gibt die Zunahme der Artenzahl der Landgefäßpflanzen der letzten 440 Millionen Jahre (M.J.) wieder. Die ersten Organismen, die das Festland vor 440 M.J. eroberten, waren primitive Tracheophyten. Eine der ersten Gefäßpflanzen ist die *Cooksonia*, die noch Sporangien trägt.

Älteste Fossilfunde dieser Pflanze, die noch keine echten Wurzeln und Blätter hatte, stammen aus dem Silur (Fundorte: Europa und Nordamerika, vor über 400 Millionen Jahre) [Campbell, 1997]. Aus der Karbonzeit (vor 286 bis 360 Millionen Jahre) weisen Fossilfunde auf ausgedehnte Wälder früher Gefäßpflanzen hin (die sogenannten Steinkohlewälder) wie Bärlappgewächse, Schachtelhalmgewächse und Farne [Schwarzbach, 1961]. Diese samenlosen frühen Gefäßpflanzen wuchsen in Sumpfbereichen auf, die zu der Zeit den Hauptteil der Kontinente bedeckten. Während des Perm (Ende des Paläozoikums, vor 248 bis 286 Millionen Jahre) veränderten sich aufgrund der Bildung des Superkontinent Pangea die klimatischen Bedingungen. Die Temperaturen stiegen an. Die Sumpflandschaften gingen zurück.

Die Pflanzen der Steinkohlewälder wurden von den sich entwickelnden Gymnospermen verdrängt. Die Bildung von Samen war sicherlich ein entscheidendes Kriterium für die starke Ausbreitung (Radiation) der Pflanzen. Der Grundbauplan der Höheren Pflanzen ist bei den Gymnospermen schon voll ausgebildet. Im Zeitalter des Mesozoikums (vor 65 bis 286 Millionen Jahre) dominieren die Gymnospermen, vor allem Koniferen und Cycadeen. Gegen Ende des Mesozoikums (Kreidezeitalter, vor 65 bis 144 Millionen Jahre) veränderten sich die klimatischen Bedingungen. Es wurde wieder kühler. Die Anzahl der Arten der Gymnospermen ging zurück. Zu Beginn der Kreidezeit (vor ca. 120 Millionen Jahren) treten vermehrt die Angiospermen auf (Wann die ersten Angiospermen wirklich auftraten und aus welchen Stammlinien sie entsprungen sind, ist unklar [Gothan et al.,1976]). Während die Verbreitung der Gymnospermen über Wind geschah, setzten die Angiospermen zur Verbreitung ihrer Art auf die Tier-Pflanze-Interaktion, indem sie Blüten ausbildeten. Dies hat neben der Weiterentwicklung des Leitgewebeaufbaus und anderen strukturellen Fortschritten zu dem Erfolg der Angiospermen beigetragen. Mit der Koevolution von Angiospermen und

Abbildung 1.2

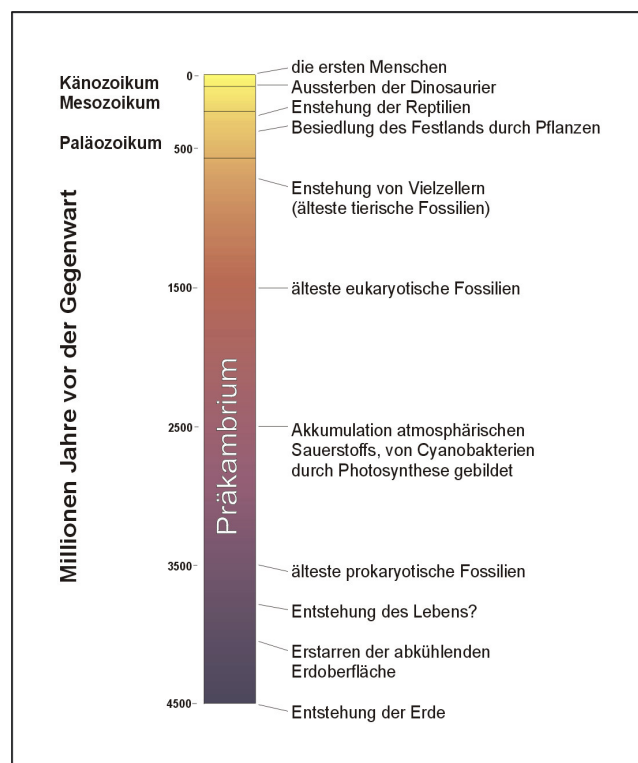


ihren Bestäubern (vor allem den Insekten) ist die Diversität der Angiospermen, ihrer Blüten, im Känozoikum (Tertiär- und Quartärzeit, vor 0,01 bis 65 Millionen Jahre) deutlich angestiegen (siehe Abb. 1.2).

Die Evolution der terrestrischen Pflanzen begann also vor 460 Millionen Jahre. Die oxygene Photosynthese ist aber wesentlich älter, wie die folgende Abb. 1.3 zeigt.

Erste fossile Spuren von Leben fand man in 3,5 Milliarden Jahre alten Stromatolithen aus Westaustralien und Südafrika, die runden und fädigen Prokaryoten ähneln [Futuyma, 1990]. Das Leben auf der Erde muß demnach irgendwann zwischen 4 Milliarden Jahre, als die Erdkruste sich zu verfestigen begann, und 3,5 Milliarden Jahre, als der Planet bereits von zur Bildung von Stromatolithen befähigten Bakterien bewohnt war, entstanden sein. Allgemein wird angenommen, daß die ersten Zellen durch chemische Evolution auf der Erde vor über 3,5 Milliarden Jahre entstanden sein könnten. Erste eukaryotische Fossilien sind 1,5 Milliarden Jahre alt. Die ältesten tierischen Fossilien sind über 600 Millionen Jahre alt (Ende des Präkambriums).

Abbildung 1.3 Einige Hauptepisoden der Geschichte des Lebens



[Campbell, 1997, bearbeitet]

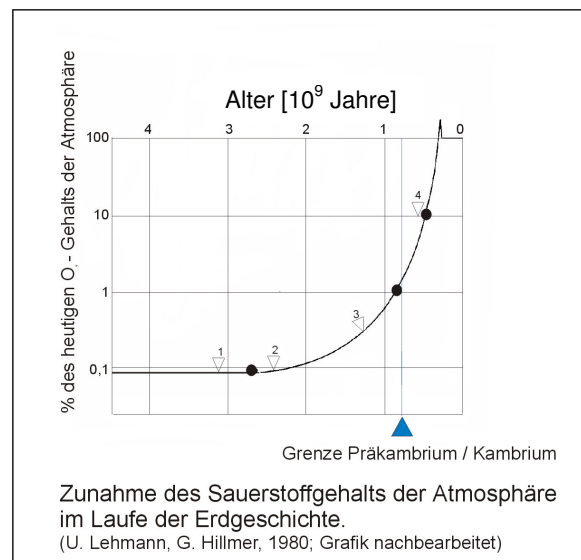
Die ersten Prokaryoten waren chemoheterotroph. Sie ernährten sich durch Aufnahme von freien organischen Verbindungen, die durch abiotische Synthese in den Urgewässern entstanden waren. Vermutlich war ATP eine dieser organischen Verbindungen. Man geht davon aus, daß im Laufe der Zeit der Anteil an freien organischen Verbindungen im Wasser immer kleiner wurde, da vermutlich die Aufnahme dieser Stoffe durch die chemoheterotrophen Prokaryoten schneller war als deren abiotische Synthese. Daher verlagerte sich der Selektionsdruck auf die biogene Synthese der organischen Verbindungen. Möglicherweise besaßen einige Prokaryoten lichtabsorbierende Pigmente, um die übermäßige Strahlungsenergie der Sonne „verarbeiten“ zu können. Dies könnte eine Voraussetzung zur Besiedlung neuer Areale gewesen sein, die stärker lichtexponiert waren. Eine Kopplung der lichtabsorbierenden Pigmente mit Elektronentransportsystemen könnte im Laufe der Evolution der Photosynthese zur Bildung von ATP gedient haben. Da zu Beginn der prokaryotischen Photosynthese die

Uratmosphäre auf der Erde reduzierend war, könnten die ersten Elektronendonatoren für den lichtbetriebenden Elektronentransport H_2 , H_2S und andere Schwefelverbindungen gewesen sein. Vor über 2,5 Milliarden Jahren entwickelten sich die Cyanobakterien, die gemeinsam mit anderen Prokaryoten in Kolonien lebten, welche die Stromatolithen bildeten. Die Cyanobakterien waren höchstwahrscheinlich die ersten Organismen, die in der Lage waren, Wasser als Elektronendonator zu nutzen, da sie den notwendigen Stoffwechselapparat entwickelt hatten. Mit der Einführung der oxygenen Photosynthese, - die Spaltung von Wasser (H_2O) erzeugt als Endprodukt molekularen Sauerstoff (O_2), veränderte sich die Atmosphäre der Erde nachhaltig. Die folgende Abbildung 1.4 zeigt den erdgeschichtlichen Anstieg des Sauerstoffgehalts in der Atmosphäre. Cyanobakterien hatten gegenüber anderen photoheterotrophen Prokaryoten den Vorteil, daß

Wasser reichlich vorhanden war. So konnten sie sich viel besser auf der Erde verbreiten. Sie begannen die prokaryotische Welt zu dominieren. Man geht davon aus, daß zunächst der aus der oxygenen Photosynthese stammende molekulare Sauerstoff aufgrund der reduzierenden Bedingung auf der Erde mit anderen chemischen Partnern, wie z.B. mit gelösten Eisenionen im Wasser reagierte. Die Bildung von roten Lagern aus Eisenoxid in 2,5 Milliarden alten Meeressedimenten wurde wahrscheinlich während dieser Periode gebildet, als die ersten Kolonien von Cyanobakterien Sauerstoff bildeten, der mit

den gelösten Eisenionen zu Eisenoxid reagierte, das dann im Wasser ausfiel und sedimentierte [Campbell, 1997]. Solche Reaktionen des *frühen* freigesetzten molekularen Sauerstoffs könnte die Akkumulation von freiem O_2 um einige hundert Millionen Jahre verschoben haben. Erst als solche Reaktionen zu Ende gingen, wurde das Seewasser mit O_2 gesättigt. Nach der Absättigung des Meerwassers mit O_2 begann der Sauerstoff auszugasen und sich in der Atmosphäre zu sammeln. Die Oxidation von eisenhaltigem Festlandgestein durch atmosphärischen Sauerstoff begann vor ca. 2 Milliarden Jahren. Die Ausbreitung des atmosphärischen Sauerstoff schuf eine immer stärker oxidierende Atmosphäre, die für die Prokaryoten des Präkambriums eine Umweltkatastrophe darstellte. Viele strikt anaerobe Prokaryoten sind verschwunden, nur wenige, die in Habitaten lebten, welche auch weiterhin anaerob blieben, überlebten diese Klimaänderung in der Atmosphäre. Die immer stärker oxydierende Atmosphäre erzeugte einen Selektionsdruck in den Prokaryoten in Richtung auf einen effektiven Schutz vor ungewollten Oxidationen in der Zelle durch Bildung geeigneter Mechanismen. In dieser Zeit muß auch die Entwicklung der aeroben Atmung begonnen haben. Man geht allgemein davon aus, daß sich die aerobe Atmung durch schrittweise

Abbildung 1.4



Modifikation der Elektronentransportketten entwickelt hat, die ursprünglich der Photosynthese dienten [Dickerson, 1980]. Möglicherweise gaben einige prokaryotische Organismen die Photosynthese auf und kehrten zur chemotrophen Ernährung zurück, während sich ihre Elektronentransportketten ausschließlich der Funktion der aeroben Atmung anpaßten. Auch Hybridformen aus photosynthetischen und respiratorischen Elementen sind entstanden (Purpurbakterien). Die bisher ältesten eukaryotischen Fossilfunde sind ca. 1,5 Milliarden Jahre alt. Vermutlich entstanden die ersten eukaryotischen Zellen aus Symbiosen zwischen Prokaryoten. Nach der Endosymbiontentheorie bestanden die Urformen der eukaryotischen Zellen aus einer symbiontischen Gemeinschaft von Prokaryoten. Kleine Arten lebten im Inneren einer Größeren Art. So sollen die Chloroplasten und Mitochondrien Nachkommen von photosynthesetreibenden Prokaryoten (Cyanobakterien) und heterotrophen, zur aeroben Atmung befähigte Prokaryoten sein [Margulis, 1970]. Innerhalb der Protisten hat sich im Laufe der Evolution der Eukaryoten die Gruppe der Algen gebildet. Schon zu Beginn des Paläozoikums (vor ca. 570 Millionen Jahre) hat es diverse Algenarten gegeben [Futuyma, 1990].

1.3 Die erdgeschichtliche Klimaentwicklung seit dem Beginn der Besiedlung der Landmassen durch die Pflanzen unter der Berücksichtigung der atmosphärischen CO₂-Konzentration.

Die Eroberung des Festlandes durch die Pflanzen begann im Zeitalter des Paläozoikums. Das Paläozoikum begann vor ca. 570 Millionen Jahre (siehe Tabelle 1.0). Es wird gemäß der Gesteinsformationen in die Perioden des Kambrium, Ordovizium, Silur, Devon, Karbon und des Perm unterteilt. Mit der Periode des Trias, die vor ca. 248 Millionen Jahre begann, fängt das Zeitalter des Mesozoikums an. Es läßt sich in die Perioden Trias, Jura und Kreide unterteilen. Das Zeitalter des Känozoikums beginnt vor ca. 65 Millionen Jahre. Es umfaßt die Perioden des Tertiär, des Quartär und des Holozän.

Das Kambrium, Ordovizium, Silur und das Zeitalter des Devon können unter der Betrachtung des Klimas zusammengefaßt werden. Für Mitteleuropa wird in dieser Phase der Erdgeschichte ein warmes bis sehr warmes (subtropisch) und vielfach trockenes Klima angenommen. Im Zeitalter des Karbon sind die Temperaturen in Mitteleuropa recht warm (subtropisch). Die Steinkohlewälder (ausgedehnte Waldareale früher Gefäßpflanzen) deuten auf ein recht feuchtes Klima hin. In der darauf folgenden Erdperiode des Perms liegen die Temperaturen zwar im subtropischen Bereich, das Klima wird aber immer arider (trockener), teilweise bis zur Extreme (Wüstenlandschaften). Mit dem Perm verschwinden die Kohlemoore (Steinkohlewälder) aus Europa fast ganz. Aus dieser Zeit stammen die wichtigsten Salzformationen (Zeugen ariden Klimas) der Erdgeschichte [Schwarzbach, 1961].

In dieser Epoche vereinigten sich die Kontinente zum Superkontinent Pangea. Im Mesozoikum (Trias, Jura und Kreide) dominierten die Reptilien [Futuyma, 1990].

Gerade das Erscheinen der großen Dinosaurier deutet auf ein warmes und feuchtes Klima hin [Schwarzbach, 1961]. Die Gymnospermen begannen im Trias dominant zu werden. Das Klima des Trias war recht warm und noch vorwiegend arid. Es gehört mit dem Zeitalter des Perms zu den besonders trockenen Perioden der Erdgeschichte. Im Laufe des Trias nahm die Aridität aber immer mehr ab. Im Erdzeitalter des Juras wurde das Klima in Europa immer feuchter und zum Teil auch kühler, aber dennoch wärmer als heute. Die Kontinente driften wieder auseinander. Die Floren des Juras und der Unter-Kreide (beginnende Kreidezeit) zeigen, daß das Klima der ganzen Erde damals recht gleichförmig gewesen sein muß. Das gesamte Mesozoikum erscheint als eine ausgesprochene Wärmezeit der Erdgeschichte. Vergletscherungen sind unbekannt und auch die Polargebiete sind durch warmes Klima mit reicher Vegetation gekennzeichnet [Schwarzbach, 1961]. Die Tabelle 1.1 zeigt die ver-

Tabelle 1.0 Die geologische Zeitskala

Ära	Periode	Epoche	Millionen Jahre von Beginn bis heute
Känozoikum	Quartär	Holozän	0,01
		Pleistozän	2,5
	Tertiär	Pliozän	5,1
		Miozän	24,6
		Oligozän	38,0
Eozän		54,9	
	Paleozän	65,0	
Mesozoikum	Kreide		144
	Jura		213
	Trias		248
Paläozoikum	Perm		286
	Karbon		360
	Devon		408
	Silur		438
	Ordovizium		505
	Kambrium		570

Die Altersangaben basieren auf Harland et al., 1982

mutliche Meerestemperatur einiger Orte Europas für das Mesozoikum. Demnach lagen die Meerestemperaturen im Mesozoikum z.T. um 10° höher als die heutigen. Daraus kann geschlossen werden, daß die atmosphärischen Durchschnittstemperaturen im Mesozoikum erheblich höher lagen als heute. Zu Beginn des Tertiär lagen die Temperaturen noch im subtropischen Bereich, fielen dann zum Ende des Tertiär stark ab und erreichten in der Tertiärepoche des Pliozän fast heutige Verhältnisse. Im Alt-Tertiär (Paleozän, Eozän und Oligozän; Zeitraum: von vor 65 M.J. bis vor 25 M.J.) lag die polare Baumgrenze auf der nördlichen Halbkugel um 20 – 30 Breitengrade nördlicher als heute. Die Vegetation war von subtropischem Charakter. So findet man im Alt-Tertiär Palmenfunde bis nach Ostpreußen und auch das deutsche Miozän (Beginn vor 25 M.J.; Dauer: ca. 20 M.J.) führte noch Palmen [Schwarzbach, 1961].

Tabelle 1.1

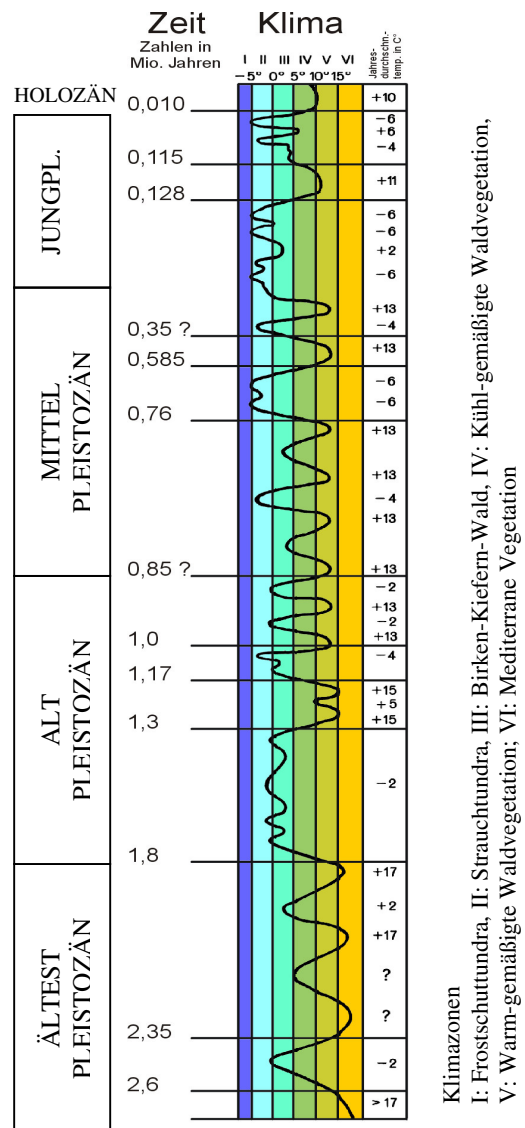
¹⁸O-Temperaturen des Meeres für das Mesozoikum
(nach UREY, LOWENSTAM, EPSTEIN, MCKINNEY; NAJDIN, TEJS, TSCHUPACHIN)

Ort	Zeitliche Einstufung	Mesozoische Temperatur in °C	Heutige Meerestemperatur in °C
Skye (Schottland)	Jura	17—23	7—13
Krim	Hauterive — Apt	13	
Krim	Ob. Alb — Cenoman	19—24	
England	Ober-Kreide	16—23	5—15
Krim	Campan	17.6	Febr. 2—6 August 24
Wolga- und Emba-Gebiet	Campan	15—21	
Tennessee	Maastricht	20—27	

[Schwarzbach, 1961 (originale Kopie)]

Der Übergang vom Alt-Tertiär zum Jung-Tertiär (vor ca. 25 M.J.) scheint zum Teil von einem recht feuchtem Klima begleitet zu sein. Darauf deuten die ausgedehnten Braunkohlelager in Deutschland hin [Schwarzbach, 1961]. Dennoch gab es in Europa stellenweise auch große Trockenheit (Saline Ablagerungen, wie z.B. die Gipsvorkommen im Pariser Becken und die Kali-Salz-Ablagerungen im Oberrheintal). Im Quartär (Beginn vor ca. 2,5 M.J) begann die dynamische Komponente des Klimas in Europa anzusteigen (siehe Abb. 1.5). Diese ist vor allem durch einen steten Temperaturwechsel charakterisiert. Der weitere Abfall der Durchschnittstemperaturen und auch die permanent sinkende CO₂-Konzentration führte im Quartär zu mehreren Wechseln von Kalt- und Warmzeiten. Es traten in Norddeutschland bisher drei große Eiszeiten auf, die als Elster-, Saale- und Weichsel-Kaltzeit bezeichnet werden. Während der Elster- und Saale-Kaltzeit drang das Inlandeis bis zum 51. Breitengrad vor. Während der Weichsel-Kaltzeit drang das Inlandeis nicht mehr so weit nach Süden vor. In Süddeutschland sind zeitlich parallel die entsprechenden Alpengletscher der Mindel- und der Riß-Kaltzeit nach Norden vorgedrungen.

Abbildung 1.5 Verlauf der Temperatur in Mitteldeutschland für das Quartär.



[Liedtke et al., 1995, verändert]

Während der Kaltzeiten sank die örtliche Mitteltemperatur gegenüber der vorherigen Warmzeit zum Teil um über 15° ab. Bisher ging man davon aus, daß sich die größeren Temperaturänderungen im Quartär auch nur in größeren Zeiträumen entwickelt haben. Aus den Ergebnissen des *Greenland Icecore Project* (GRIP) kann aber geschlossen werden, daß innerhalb der Übergangszeiten zwischen Kalt- und Warmzeiten insbesondere bei einem schnellen Übergang von einer Kaltzeit zur nächsten Warmzeit es zu einem regelrechtem *Klimaflattern* kommt. In einer solchen Phase sind bis zu 14° C Temperaturdifferenz in wenigen Jahrzehnten nachgewiesen worden [Borsch et al., 1998].

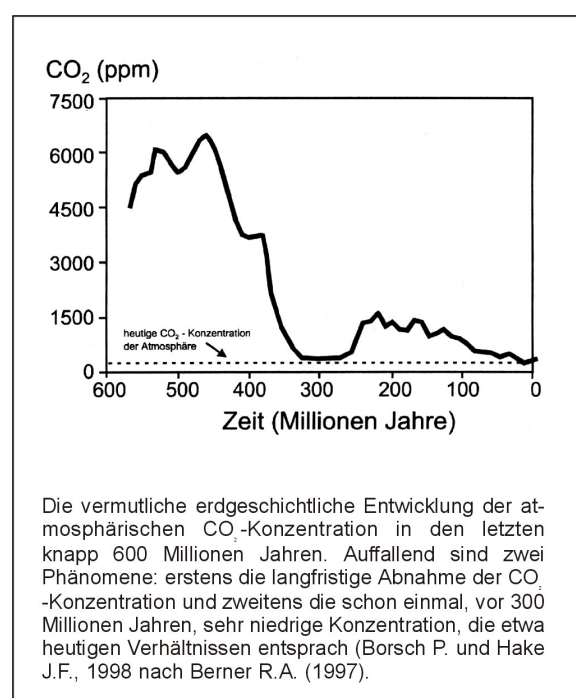
Während also das Klima in Europa im Erdzeitalter des Paläozoikum als auch des Mesozoikum über lange Zeiträume von mehreren 10 Millionen Jahren konstant war, stieg die dynamische Komponente (es handelt sich dabei um den stetig variierenden Teil) des Klimas seit dem Jung-Tertiär stark an und führte im Quatär zu einem steten Wechsel von Warm- und Kaltzeiten.

Nach dem Rückzug der letzten Eisfront (die Weichselkaltzeit) von den mittelschwedischen Endmoränen begann vor 10.000 Jahren das Holozän. *“Die Pflanzen wanderten wieder ein, die Landschaft verjüngte sich dadurch, die großen Seen entstanden, und ein wirres Flußnetz bildete sich heraus. Das ist die Landschaft, in die der Mensch einwandert und die er umformt“* [Liedtke et al., 1995]. Aus dem Vergleich der Dauer der letzten Warmzeit (auch als *Eem* bezeichnet) vor der Weichselkaltzeit könnte man schließen, daß die bisherige aktuelle (heutige) Warmzeit (Holozänwarmzeit) ihrem Ende zugeht. Dafür spräche auch die holozäne Waldentwicklung, die man aufgrund der pollenanalytischen Untersuchungen sehr gut kennt.

Aufgrund solcher Analysen könnte man zu dem Ergebnis kommen, daß die Waldzusammensetzung bereits ihrem Endzustand zustrebt, wie man von bisherigen Warmzeiten weiß [Liedtke et al., 1995].

Im Folgendem wird die erdgeschichtliche Entwicklung der atmosphärischen CO₂-Konzentration seit dem Beginn der Wanderungsbewegung der phototrophen Organismen vom Wasser auf das Land bis heute beschrieben. Die Abbildung 1.6 zeigt die Entwicklung der CO₂-Konzentration seit dem Beginn des Paläozoikum. Als vor über 460 Millionen Jahren die phototrophen Organismen vom Wasser auf das Land wanderten, lag die CO₂-Konzentration in der Atmosphäre bei 6000 ppm. Mit der Entwicklung der frühen samenlosen Gefäßpflanzen (Pteridophyten) und deren starke Ausbreitung im

Abbildung 1.6 Die erdgeschichtliche Entwicklung der atmosphärischen CO₂-Konzentration



Karbon vor über 300 Millionen Jahre (die sogenannten Steinkohlewälder) fiel der CO₂ Gehalt in der Atmosphäre auf das Niveau der heutigen CO₂-Konzentration ab. Am Ende des Erdzeitalters des Perms vor über 250 M.J. stieg die CO₂-Konzentration wieder auf das 4 bis 5fache der heutigen Konzentration an, fiel dann aber erneut langsam ab und erreichte wahrscheinlich schon zum Ende des Tertiär heutige Verhältnisse. Seit ca. 160.000 Jahren liegt der CO₂-Gehalt mit 180 - 220 µmol CO₂ / mol während der Eiszeiten und mit 250 - 300 µmol CO₂ / mol zwischen den Eiszeiten atypisch niedrig [Post et al., 1990]. Der starke Abfall der CO₂-Konzentration im Devon und Karbon beruhte wahrscheinlich nicht nur auf der zunehmenden CO₂-Fixierung der sich ausbreitenden samenlosen Gefäßpflanzen, sondern auch auf der verstärkten Ausbildung langer Wurzeln, die tief in den Boden hinein ragten. Nach Retallack [1997] findet man den ersten gut ausgebildeten Waldboden im Devon. Dies trug zu einer chemischen Verwitterung von Silikaten im Boden bei, die zu einer starken Abnahme der atmosphärischen CO₂-Konzentration führte [Berner, 1997]. Möglicherweise steht der drastische Abfall der atmosphärischen CO₂-Konzentration im Devon und Karbon mit der großen permo-karbonischen Vereisung, nach Schwarzbach [1961] auch als das *permo-karbonische Eiszeitalter* bezeichnet, auf der Südhalbkugel der Erde im Zusammenhang [Berner, 1997]. Die Zunahme der CO₂-Konzentration im spätem Perm auf das 4 bis 5fache der heutigen Konzentration steht wahrscheinlich mit dem Rückgang der Steinkohlewälder und der Zunahme der Fauna auf dem Festland in Zusammenhang. Der kontinuierliche Rückgang der atmosphärischen CO₂-Konzentration seit der Kreidezeit beruht möglicherweise auf der starken Ausbreitung als auch auf der zunehmenden Diversität der Angiospermen. Natürlich können auch abiotische Prozesse für den Rückgang der atmosphärischen CO₂-Konzentration eine Rolle spielen.

Die Frage nach den Ursachen der natürlichen Klimaänderungen im Laufe der Erdgeschichte insbesondere des Quatärs mit den wechselnden Kalt- und Warmzeiten ist bis heute nicht eindeutig geklärt [Borsch et al., 1998]. Neben dem erdgeschichtlichen Verlauf der atmosphärischen CO₂-Konzentration werden geologische, physikalische als auch chemische Prozesse innerhalb des globalen Klimasystems bei der Frage nach den Gründen zur Entstehung der großen Kaltzeiten diskutiert. Zudem werden auch mögliche extraterrestrische Einflüsse auf das Klima der Erde in Betracht gezogen. Bis heute weiß man nicht, ob die Solarkonstante auch über sehr lange Zeiträume hinweg als konstant betrachtet werden kann. Eine Änderung der physikalischen Prozesse in der Sonne oder an der Sonnenoberfläche kann die abgestrahlte Energie langfristig verändern. Die Stärke der Sonnenstrahlung, die auf die Erdoberfläche fällt, hängt einerseits von der Entfernung der Erde zur Sonne und andererseits vom Einfallswinkel ab. Da die elliptische Erdbahn und die Erde selbst im Gravitationsfeld der Sonne langfristige Pendelbewegungen ausführen, ergeben sich daraus zeitliche Änderungen der Erdbahnelemente. Diese zyklisch auftretenden Perioden, die in Zeitintervallen von etwa 20.000, 40.000 und 100.000 Jahren auftreten, verändern die Stärke der Sonnenstrahlung und bewirken eine Veränderung in der Gesamtstrahlungsbilanz der Erde [Borsch et al., 1998]. Der Verlauf dieser

Zyklen stimmt in etwa mit dem zeitlichen Verlauf der Kalt- und Warmzeiten im Quartär überein. Daraus entwickelte sich in den dreißiger Jahren des Zwanzigsten Jahrhunderts die sogenannte *Milankowitch-Theorie*. Diese Theorie ist nicht unumstritten, da die daraus theoretisch resultierenden Temperaturänderungen nicht für den Beginn als auch für das Ende einer Kaltzeit allein verantwortlich sein können. Sie hat jedoch unter der Berücksichtigung komplexer Rückkopplungsvorgänge bei bereits vorhandener Eisdecke ein erneutes Interesse gefunden. Letztlich ist das Klima der Erde das Resultat eines sehr komplexem Klimasystems [Borsch et al., 1998].

Seit der industriellen Revolution (1752) steigt der CO₂-Gehalt in der Atmosphäre wieder an. Die Verbrennung fossiler Rohstoffe wie des Erdöles und der Steinkohle, sowie die gleichzeitige Rohdung gewaltiger Waldareale wie der Regenwälder führt zu einer massiven Verschiebung des terrestrisch gebundenen Kohlenstoffes hin zur Atmosphäre. Somit steigt der dynamische atmosphärische Kompensationspunkt des CO₂ um durchschnittlich 1,5 µmol / mol pro Jahr an [Keeling und Whorf, 1992]. Es gilt als sicher, daß sich der CO₂-Gehalt in diesem Jahrhundert verdoppeln wird. Die treibende Kraft für diesen Anstieg ist eindeutig anthropogener Natur.

CO₂ hat einen Einfluß auf das Klima der Erde. Als „Treibhausgas“ bewirkt es eine Reflexion der Wärmestrahlen in der Atmosphäre. Somit erwärmt sich das Klima in der Atmosphäre um 1,5° bis 4,5° Celsius im nächsten Jahrhundert [Houghton et al., 1990].

1.4 Die Anpassungserscheinungen Höherer Pflanzen vom C₃-Typ auf eine erhöhte CO₂-Atmosphäre.

Seit schon mehr als einem Jahrhundert ist bekannt, daß eine Erhöhung der CO₂-Konzentration die Photosynthese als auch das Wachstum von Pflanzen stimuliert [Bowes, 1996]. Dennoch variieren die experimentellen Daten über die Anpassungserscheinungen von Höheren Pflanzen an eine erhöhte CO₂-Atmosphäre. Sicherlich liegt es zum Einen an den unterschiedlichen Systemen, die benötigt werden, um eine erhöhte CO₂-Atmosphäre zu erzeugen, und andererseits an den generellen Bedingungen der Pflanzenaufzucht. So sind z.B. unterschiedliche Größen von Erdvolumen, die einer Pflanze im Experiment geboten werden, eine Ursache für divergierende Ergebnisse in der Anpassungserscheinung an eine erhöhte CO₂-Konzentration in der Luft [Bowes, 1993; Sage, 1994; Arp, 1991]. Aber auch die Zugänglichkeit von Stickstoff, Phosphat und Mineralien für die Pflanze lassen die Ergebnisse variieren. Natürlich spielt auch die Art der Beleuchtung (bei Klimakammeraufzuchten) eine entscheidene Rolle [Makino, 1994]. Ein weiterer wichtiger Grund für die Variabilität der Ergebnisse liegt natürlich an der Auswahl der Pflanzenspezies und deren physiologischem Grundzustand. So ist die Anpassung eines Pflanzentyps an eine erhöhte CO₂-Konzentration mit einem *Source/Sink* (Quell/Verbrauch) Verhältnis von deutlich größer als 1 eine andere als bei einem Pflanzentyp mit einem *Source/Sink* Verhältnis von unter 1, obschon beide

Pflanzentypen ein verstärktes Wachstum unter erhöhtem CO₂-Gehalt aufweisen können. Mit dem englischen Begriff *Source* (Quelle) ist der Produktionsort und mit dem Wort *Sink* der Verbrauchsort (oder Abfluß) gemeint. Bei den Höheren Pflanzen findet die Photosynthese hauptsächlich in den Blättern statt. Daher bezeichnet man die Blätter auch als *Source* und die Wurzel als *Sink* (Abfluß) [Held, 1996]. So wirken Manipulationen im *Source / Sink* Verhältnis in Soja- und Tomatenpflanzen durch Entfernung von Blättern (*Source*), Früchten und Schoten (*Sink*) direkt auf die Raten der Photosynthese der Blätter ein. Pflanzen mit einem niedrigen *Source / Sink* Verhältnis (< 1) zeigen bei Wachstum unter erhöhtem CO₂-Gehalt eine stärkere Stimulierung der Photosyntheseraten als Pflanzen mit einem hohen *Source / Sink* Verhältnis [Farrar & Williams, 1991].

Bei der Erforschung der Anpassungserscheinungen Höherer Pflanzen an eine erhöhte CO₂-Konzentration in der Versuchsatmosphäre unterscheidet man zwischen *short-term & long-term acclimation*. Werden die Pflanzen nur für einige Stunden in eine erhöhte CO₂-Atmosphäre exponiert, so spricht man von *short-term treatment*; werden sie über Tage, Wochen oder Jahre in eine solche Versuchsatmosphäre ausgesetzt, so wird von einem *long-term treatment* gesprochen [Bowes, 1996].

Viele Studien sind an Kulturpflanzen vorgenommen. So zeigen ein Großteil der C₃-Getreidesorten bei Wachstum unter einer erhöhten CO₂-Konzentration von 700 ppm eine durchschnittliche Steigerung von 30 bis 41% in der Biomasse und Ertrag [Cure and Acock, 1986; Kimball, 1983]. Häufig kommt es bei den Langzeit-Untersuchungen zunächst zu einer signifikanten Steigerung der Netto-Photosynthese, die dann mit zunehmender Dauer der Untersuchung abfällt. Da jedoch Kulturpflanzen nicht benutzt werden können, um die Anpassung natürlicher Pflanzen an ein erhöhte CO₂-Atmosphäre vorherzusagen, sind auch Wildtypen von Getreidesorten eingesetzt worden. Denn natürlich entstandene Pflanzen zeigen eine größere physiologische und ökologische Bandbreite als Kulturpflanzen [Hunt et al., 1991]. Natürliche Pflanzenarten zeigen außerdem eine große Bandbreite an Strategien, die ihnen das Überleben sichern [Grime, 1974]. Pflanzen, die zum Überleben auf Konkurrenz setzten, d.h. die schnell wachsen (Konkurrenz um Licht) und/oder eine hohe Reproduktion aufweisen, akkumulieren bei Wachstum unter erhöhtem CO₂-Gehalt (700 µmol CO₂ / mol) gegenüber den Kontrollanzuchten deutlich mehr Trockengewicht. Bei Pflanzen, die andere Überlebensstrategien zeigen, welche z.B. höheren Umweltstress (extreme Umweltbedingungen) ertragen können, fällt die Zunahme des Trockengewichtes bei Wachstum unter erhöhtem CO₂ gegenüber den Kontrollansätzen gering aus. Dies bestätigt auch eine Literaturanalyse von 156 Pflanzenarten [Poorter, 1993]. So zeigen die meisten Getreidesorten, welche eher auf Konkurrenz als Überlebensstrategie setzten, einen deutlich stärkeren Zuwachs an Trockengewicht gegenüber den Wildtypen (58 % zu 35 %). Schnell wachsende Sorten zeigen eine höhere Stimulierung der Trockengewichtzunahme als langsamwachsende (54 % zu 23 %). Jedoch kann auch eine unterschiedliche Verbrauchs-Kapazität (*Sink*) für die in der Photosynthese erzeugten Kohlenhydrate oder Zucker für die Unterschiede im Zuwachs an Trockengewicht unter erhöhter CO₂-Atmosphäre mitverantwortlich sein.

Die Langzeit-Anzucht von Höheren Pflanzen unter erhöhtem CO_2 führt auch zu unterschiedlichen physiologischen Effekten, die die Photosynthese direkt oder indirekt beeinflussen, wie etwa Veränderungen in der Blattfläche, Blattdicke, Grad der Verzweigung, Stamm- und Wurzel-Trockengewicht sowie in der Entwicklungsgeschwindigkeit der Pflanzen [Bowes, 1993, Allen, 1990].

Die Verdoppelung der CO_2 -Konzentration auf $700 \mu\text{mol} / \text{mol}$ (entspricht 700 ppm CO_2) führt häufig zu einer Herabsetzung der stomatäre Leitfähigkeit (Kurzform: g_s) der Pflanzen gegenüber den Kontroll-Pflanzen, wenn die stomatäre Leitfähigkeit (g_s) bei $350 \mu\text{mol CO}_2 / \text{mol}$ gemessen wird. Jedoch kann die g_s bei höheren CO_2 -Konzentrationen der *CO₂-Pflanzen* gegenüber den Kontroll-Pflanzen gleichhoch ausfallen (z.B. bei hohen Lichtintensitäten) [E.Reining, 1994]. Andererseits zeigen andere Studien keine signifikante Veränderung der g_s [Arp and Drake, 1991] bei *CO₂-Pflanzen*. Es scheint so, daß die g_s zu Beginn des Experimentes bei den *CO₂-Pflanzen* reduziert ist, aber nach längerer Aussetzung unter einer erhöhten CO_2 -Konzentration sich den Kontroll-Anzuchten angenähert hat [Grulke et al., 1993]. Dennoch ist die *Water Use Efficiency* (WUE, Wasser-Nutz-Effektivität) bei *CO₂-Pflanzen* gegenüber den Kontroll-Anzuchten häufig signifikant erhöht [Eramus, 1991, Morison, 1993]. Das Herabsetzen der stomatären Leitfähigkeit der Pflanzen bei Wachstum unter erhöhtem CO_2 von 700 ppm hält auch das C_i / C_a Verhältnis (interner zu äußerer CO_2 -Gehalt) konstant. Auch bei Langzeituntersuchungen wird meist keine große Veränderung des C_i / C_a Verhältnisses bei C_3 -Pflanzen beobachtet [Sage, 1994]. Natürlich wird die stomatäre Limitierung für CO_2 bei Verdoppelung der CO_2 Konzentration reduziert, denn der interne CO_2 Gehalt (C_i) steigt von 245 auf $490 \mu\text{mol CO}_2 / \text{mol}$ an [Bowes, 1996]. Dieser Anstieg kann möglicherweise der Grund für die Steigerung der Photosynthese zu Beginn des Experimentes sein. Somit wird die Photosynthese in die RuBP (Ribulose-1,5-bisphosphat) limitierenden Region der *A / C_i Kurve* (Assimilation / interner CO_2 -Gehalt) verschoben [Stitt, 1991; Woodrow, 1994]. Die Langzeit-Anzucht der Pflanzen unter erhöhtem CO_2 kann die *A / C_i Kurve* im Bereich der Neigung und/oder in der RuBP limitierenden Region verändern. Der Verlauf der *A / C_i Kurve* bei *CO₂-Pflanzen* fällt jedoch nicht einheitlich aus. Gerade die experimentellen Bedingungen wie zu geringe Größe des Erdvolumens sowie restriktive Stickstoffdüngung können die Assimilation von C unter gegebenen C_i Konzentrationen bei CO_2 -Pflanzen deutlich reduzieren [Sage, 1994]. Freilandversuche zeigen häufig keine Herabsetzung der Assimilation von C. Manchmal zeigen die *CO₂-Pflanzen* in Freilandversuchen sogar eine Steigerung der Assimilation [Arp and Drake, 1991; Sage, 1994]. Nur unter bestimmten Feldsituationen, wie relativ niedrige Temperaturen, Wettbewerb um Licht, Wasser und Nährstoffe können einen restriktiven Einfluß auf die Anpassung an eine erhöhte CO_2 -Atmosphäre haben [Bowes 1996]. Ob die häufig beobachtete Herabsetzung der CO_2 -Assimilation bei *CO₂-Pflanzen* dennoch auch in der Natur zu beobachten sein wird, bleibt eine offene Frage [Bowes, 1996]. Möglicherweise steht die Herabsetzung der CO_2 -Assimilation nach der Initialsteigerung der Photosynthese mit einer Veränderung der *Source/Sink Balance* im Zusammenhang [Farrar & Williams, 1991, Arp, 1991]. Denn häufig

ist das Kohlenstoff / Stickstoff (C/N) Verhältnis der *CO₂-Pflanzen* deutlich größer als das der Kontroll-Pflanzen. Das Extra an Kohlenstoff muß verarbeitet werden. Dies kann bedeuten, daß interne Nährstoffquellen wie Stickstoff verfügbar gemacht werden müssen. Demnach werden nichtlimitierte Komponenten, also Komponenten, die im Überfluss vorhanden sind, abgebaut und die so wieder verfügbaren Nährstoffe hin zu limitierten Komponenten verschoben [Sage, 1994; Bowes, 1991]. Ist die Stickstoffzugabe im *CO₂-Experiment* unzureichend oder bewußt herabgesetzt, so tritt eine signifikante Reduzierung im Stickstoffgehalt pro Blattfläche oder pro Einheit Trockengewicht auf. Das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff verschiebt sich dann deutlich in Richtung Kohlenstoff, obwohl auch der Gehalt an Rubisco pro Einheit Protein oder pro Blattfläche stark erniedrigt wird. Dennoch kann eine relative Stimulierung der Photosynthese und des Wachstum eintreten, auch wenn Stickstoffmangel die absolute Photosyntheserate herabsetzt [Bowes, 1996]. Mag die Aufnahme an N unter erhöhtem CO₂ verstärkt sein, so scheint sie jedoch nicht mit der Kohlenstoff-Aufnahme mithalten. Es ist häufig viel mehr so, daß selbst bei hohen Stickstoff-Zugaben die N-Konzentration geringer und die *Use-Efficiency* (Nutzeffektivität) von N in *CO₂-Pflanzen* erhöht ist [Conroy and Hocking, 1993; Mitchel et al., 1993]. Dagegen scheint der Gehalt an Phosphor P in Blättern nicht so durch eine CO₂-Erhöhung modifiziert zu werden [Conroy and Hocking, 1993]. Jedoch kann eine vermehrte Zugabe an P den Ernteertrag von *CO₂-Pflanzen* durchaus steigern, wie Untersuchungen an Reis (*Oryza sativa* L.) aufzeigen [Seneweera and Conroy, 1997].

Eine weitere wichtige Interaktion mit CO₂ ist die Aufnahmemöglichkeit von Wasser und Salzen. Daher sind auch Untersuchungen zur Anpassungserscheinung Höherer Pflanzen unter verschiedenen CO₂-Konzentrationen bei gleichzeitigem Wasser- und / oder Salzstress durchgeführt worden. Wie schon beschrieben, steigt die Water Use Efficiency (WUE) Höherer Pflanzen bei Wachstum unter erhöhtem CO₂ an. Maßgeblich für die Steigerung der WUE ist die Reduzierung der stomatären Leitfähigkeit (g_s) von *CO₂-Pflanzen* durch Erniedrigung der stomatären Dichte der Blätter. Andererseits trägt der Anstieg der Kohlenstoffassimilation ebenfalls zur Steigerung der WUE bei den *CO₂-Pflanzen* bei. Dies kann dazu führen, daß *CO₂-Pflanzen* mit Wasserstress (Reduzierung der Wasserzugabe) besser klarkommen als die entsprechenden Kontrollaufzuchten. Die Verringerung des Wasserverlustes bei den *CO₂-Pflanzen* führt letztendlich dazu, daß der Wasserstress später einsetzt [Bowes, 1996; Vu et al., 1998]. *CO₂-Pflanzen* zeigen bei Trockenheit einen schwächeren Abfall des Blattwasserpotentials als die Kontrollanzuchten. Das Wachstum der Pflanzen unter einer erhöhten CO₂-Konzentration in der Versuchsatmosphäre bewirkt eine „Desensibilisierung“ der Pflanzen gegenüber Wasserstress [Sgherri et al., 1998]. So führt auch das Wachstum von *Quercus robur* Setzlingen unter erhöhtem CO₂, kombiniert mit Trockenheit, zu einer Verbesserung der Kohlenstoff-Nutzung in den Wurzeln, ganz gleich ob mit oder ohne Wasserstress [Vivin und Guehl, 1997]. Für die meisten Pflanzenarten bewirkt das Wachstum unter erhöhtem CO₂ auch eine Erhöhung der Toleranz gegenüber moderatem Salzstress [Bowes, 1996]. Die Salzkonzentration im Blattgewebe erfährt durch die Erhöhung der CO₂-Konzentration keine Ver-

änderung. Die Aufnahme und der Transport der Salze scheint fest reguliert zu sein, da ein erhöhtes Wachstum sowie eine Herabsenkung des Wasserverbrauchs bei *CO₂-Pflanzen* die Aufnahme von Salzen nicht behindert [Bowes,1996]. Es kann sogar, wie eine neue Untersuchung an Erdbeeren (*Fragaria x ananassa Duch. Cv. 'Elsanta'*) zeigt, zu einer signifikanten Zunahme an Salzen (K, Ca, Mg) in allen Organen der Pflanze kommen [Chen et al., 1997].

Da seit der industriellen Revolution die *CO₂*-Konzentration in der Atmosphäre kontinuierlich ansteigt, lag es nahe sich zu fragen, ob in diesem Zeitraum eine Anpassung der Höheren Pflanzen auf die kontinuierliche Erhöhung der *CO₂*-Konzentration in der Luft schon stattgefunden hat. In einer Studie aus dem Jahre 1987 [Woodward] wurde die Dichte der Stomata pro Blattfläche einer Pflanzensammlung mäßig-krautiger Arten aus dem Jahre 1787 mit der Dichte heutiger Pflanzen verglichen. Dabei fand Woodward eine Verringerung der stomatären Dichte der Blätter, und zwar um 67 % bei heutigen Arten im Vergleich zur Pflanzensammlung aus dem Jahre 1787. Ausgehend von der Erniedrigung der Anzahl der Stomata pro Blattfläche als Anpassungserscheinung auf eine steigende *CO₂*-Konzentration in der Atmosphäre, kalkulierte Woodward eine Steigerung der WUE um das 2fache bei den heutigen Arten. Andere Forscher konnten ebenfalls mit Hilfe von Pflanzensammlungen mediterraner Arten ähnliche Ergebnisse aufzeigen [Bowes 1996]. Eine Steigerung der *CO₂*-Konzentration in der Atmosphäre könnte demnach zu einer Verringerung der stomatären Leitfähigkeit führen, die als Effekt eine Verbesserung der WUE nach sich zieht, was auch experimentell bestätigt wurde. Dennoch nicht alle vergleichenden Studien kommen zu dem selben Ergebnis. So konnten Untersuchungen der stomatären Dichte von *Quercus pubescens*, die an natürlichen Gasquellen in Zentralitalien mit sehr hoher *CO₂*-Emmission (bis zu 96 %) wachsen, keine Korrelation zwischen der Entfernung der Pflanzen zu den Gasquellen und der stomatären Dichte aufzeigen. Lediglich die Größe der Porenlänge der Spaltöffnungen war bei den Pflanzen verkleinert, die nahe an den Gasquellen aufwuchsen [Bowes, 1996].

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß man davon ausgehen kann, daß in einer zukünftigen erhöhten *CO₂*-Atmosphäre von ca. 700 $\mu\text{mol CO}_2 / \text{mol das Wachstum}$, die Photosynthese und die WUE vieler *C₃*-Pflanzen verstärkt sein kann. Jedoch wirken auch immer geographische und geologische Bedingungen wie Sonneneinstrahlung, Temperatur, Witterungsbedingungen, Bodenvolumen und -beschaffenheit auf die Anpassungserscheinungen der Höheren Pflanzen an eine erhöhte *CO₂*-Atmosphäre ein. Daneben zeigen nicht alle Pflanzenarten eine positive Anpassung. Unterschiedliche Überlebensstrategien führen zu unterschiedlichen Anpassungserscheinungen an den erhöhten *CO₂*-Gehalt. Auch die grundsätzliche Erhöhung der globalen Temperatur in der Atmosphäre kann lokal zu höheren Temperaturanstiegen führen als dem globalen Wert entspricht. Liegt der lokale Anstieg der Temperatur über dem Optimum, so können Stressfaktoren die positiven Anpassungen an eine erhöhte *CO₂*-Welt erniedrigen oder sogar beseitigen. Sicher ist, daß *C₄*-Pflanzen aus der Erhöhung der *CO₂*-Konzentration keine besonderen Nutzen ziehen werden, diese ihnen aber

auch nicht schadet. Darüber hinaus sind viele Beobachtungen der Anpassungserscheinungen an eine erhöhte CO₂-Welt an Kulturpflanzen vorgenommen worden. Wie sich natürliche Ökosysteme an erhöhte CO₂-Atmosphäre anpassen, ist relativ unklar.

1.5 Anpassungserscheinungen der Lichtreaktion der Photosynthese von C₃-Pflanzen bei Wachstum unter einer erhöhten CO₂-Atmosphäre von 700 ppm.

Bei der Betrachtung der Anpassungserscheinung von C₃-Pflanzen auf die Photosynthese bei Wachstum in einer erhöhten CO₂-Atmosphäre wurde fast ausschließlich auf die Assimilation von Kohlenstoff (C) versus C_i (Interner CO₂-Gehalt) oder versus Lichtintensität geachtet [Sage, 1994]. Dies ist natürlich eine berechtigte Sichtweise auf die Anpassungserscheinungen von C₃-Pflanzen auf eine erhöhte CO₂-Konzentration, da CO₂ direkt mit dem Calvin-Zyklus (dem Calvin-Enzym Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase, Kurzform: Rubisco) interagiert [Stitt, 1991]. Bisher sind nur wenige Untersuchungen hinsichtlich der langzeitigen Anpassung der Lichtreaktion und der daran beteiligten Multiproteinkomplexe der Photosynthese durchgeführt worden [Van Oosten, Wilkins & Besford, 1994, 1995; Robertson and Leech, 1995; Makino, 1994; Makewicz et al., 1995 a, b; He et al., 1996].

Immuncytologische Untersuchungen an jungen Weizenblättern (*Triticum aestivum cv Hereward*, Alter: 7 Tage) zeigen bei ca. 10 bis 20 % der Mesophyllzellen eine signifikante Reduzierung des 33 kDa Protein (manganstabilisierendes Protein, MSP) des Sauerstoffentwickelnden Komplexes (*Oxygen-Evolving Complex, OEC*) von PSII und der Cytochrom f -Untereinheit des Cytochrom b₆f Komplexes bei den *CO₂-Pflanzen* [Robertson and Leech, 1995]. Auch Untersuchungen der Transkription einzelner Photosynthesegene zeigen eine Veränderung in der Genexpression von Tomatenpflanzen (*Lycopersicon esculentum*) auf, die einem hohem CO₂-Gehalt von 2000 ppm für 9 Tage ausgesetzt waren. Die *CO₂-Pflanzen* zeigten eine Reduzierung der Transkription der LHC I & II Gene (*cab-7* und *cab-3c*) sowie des *Rca*-Gens, welche für die Rubisco-Aktivase codiert. Die Höhe der mRNA der *psaA/B* Gene (Core-Peptide von PSI) und des *psbA* Gens (D1 Protein von PS II) und der Glykolatoxidase, welche in der Photorespiration involviert ist, blieb dagegen unverändert [Van Oosten, Wilkins & Besford, 1994]. Makewicz [1995 a, b] konnte an isolierten PSI-Komplexen aus Tabak (*Nicotiana tabacum var John William's Broadleaf*) eine Zunahme der *psaA/B* Untereinheit (Reaktionszentrum von Photosystem I) bei den *CO₂-Pflanzen* aufzeigen. Möglicherweise reagieren Pflanzen in ihrer Anpassung des Photosyntheseapparates an eine erhöhte CO₂-Konzentration in der Versuchsatmosphäre ähnlich wie auf eine Erhöhung der Lichtintensität durch Reduzierung der photosynthetischen Einheit (PSII, PSI, LHC) [He et al., 1996].

1.6 Forschungsansatz

Der Schwerpunkt vieler wissenschaftlicher Untersuchungen zur Anpassung der Photosynthese Höherer Pflanzen an eine *erhöhte CO₂-Welt* lag in der Beobachtung der Anpassungserscheinungen von Enzymen des Calvin-Zyklus (z.B. durch Messung der Assimilation von CO₂), insbesondere der Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) und der Rubisco-Aktivase. Bisher sind nur wenige Untersuchungen zur Anpassung der photosynthetischen Lichtreaktion und der daran beteiligten Multiprotein-Komplexe an eine erhöhte CO₂-Atmosphäre durchgeführt worden. Daher ist das bisherige Bild über die Anpassung der Lichtreaktion der Photosynthese Höherer Pflanzen nur sehr lückenhaft. Hier bedarf es weiterer Untersuchungen, um das Bild zu vervollständigen. Die bisherigen wissenschaftlichen Untersuchungen zur Anpassung der photosynthetischen Lichtreaktionen Höherer Pflanzen in einer erhöhten CO₂-Atmosphäre erbrachten zum Teil sehr interessante Ergebnisse (siehe Kapitel 1.5). Demnach scheint die Anpassung der Lichtreaktion der Photosynthese an erhöhtes CO₂ ähnlich wie die Anpassung an eine erhöhte Lichtintensität zu verlaufen. Daß dies nicht abwegig ist, zeigt der Rückblick auf die Evolution der terrestrischen Pflanzen unter dem klimatischen Aspekt und der besonderen Betrachtung der Lichtreaktionen der Photosynthese.

Zu Beginn der Besiedlung des Festlandes durch die Pflanzen vor ca. 460 Millionen Jahren war die CO₂-Konzentration im Vergleich zu heute um den Faktor 16 größer und die O₂-Konzentration in der Atmosphäre niedrig (ca. 10 % der heutigen O₂-Konzentration). Zudem lag die Temperatur in der Atmosphäre im Vergleich zu heute wesentlich höher. Es ist daher anzunehmen, daß das Spektrum des einfallenden Sonnenlichtes zu Beginn der Evolution der terrestrischen Pflanzen breiter und die Strahlung härter gewesen ist. Damit ist gemeint, daß der Anteil der sehr kurzwelligen Strahlen im Gesamtspektrum des einfallenden Sonnenlichtes größer war. Der Grund hierfür kann in der niedrigen Konzentration an atmosphärischem O₂ liegen, was sich dann auch auf die Dicke der Ozonschicht in der oberen Atmosphäre auswirkt. Diese wird vor 460 Millionen Jahren, falls überhaupt vorhanden, drastisch geringer gewesen sein als heute. Ein solches Szenario würden die Pflanzen bevorzugen, die in der Lage sind hohe Lichtintensitäten „zu verarbeiten“, ohne daß eine Lichtschädigung des Photosyntheseapparates eintritt. Die ersten zur oxygene Photosynthese befähigten Organismen waren Einzeller (Cyanobakterien). Diese lebten und leben noch heute im Wasser. Sie entstanden vor über 2,5 Milliarden Jahre. Die damalige O₂-Konzentration in der Atmosphäre lag unter 0,1 % des heutigen Wertes. Wasser absorbiert mit zunehmender Tiefe extrem viel Strahlungsenergie. Daher stellte sich für Cyanobakterien nicht das Problem, wie sie sich gegen die harten Strahlen der Sonne schützen konnten. Sie brauchten sich nur in der passenden Wassertiefe zu befinden, um diesem Problem auszuweichen. Auch heute noch wechseln fädige Cyanobakterien wie *Oscillatoria* je nach Strahlungsintensität die Wassertiefe. Dieses Verhalten kann man in den Seen Afrikas beobachten.

Die Grundprinzipien der photosynthetischen Wasserspaltung, der Lichtreaktion der beiden Photosysteme I & II, des photosynthetischen Elektronentransportes und der Bildung von ATP und NADPH+H⁺ haben sich schon bei den Cyanobakterien entwickelt. Mit der Eroberung des neuen Lebensraums Land war die Entwicklung neuer *Baupläne* von Nöten. Der *Grundbauplan* Höherer Pflanzen in Wurzel, Sproß und Blatt (Blattkrone) ist aus der schrittweisen Anpassung an die „Landbedingungen“ einschließlich gegenseitiger Konkurrenz entstanden und war schon bei den Gymnospermen voll ausgebildet. Fossile Überreste erster Gymnospermen findet man im Devon (Beginn vor 408 Millionen Jahre) [Futuyma, 1990]. Unter den hohen Lichtintensitäten zu Beginn der terrestrischen Photosynthese kam es bei den ersten Gefäßpflanzen zu keiner nennenswerten Ausbildung eines Lichtsammel-Antennenkomplexes. Einige Arten wie die *Psilophyten* (aus dem Mittel-Devon, vor ca. 380 Millionen Jahren) waren nur spärlich beblättert oder waren sogar Blattlos wie *Rhynia* und *Horneophyton* [Gothan et al., 1976]. Auch dies ist eine Anpassung an die sehr hohen Lichtintensitäten zu Beginn der Evolution der terrestrischen Pflanzenwelt. In der Erdepöche des Karbon (Beginn vor 360 Millionen Jahren) dominierten dann die Pflanzen der Steinkohlewälder. Im Allgemeinen wird die Steinkohleflora als Sumpfflora angesehen. Dennoch gibt es bei einigen dieser Karbonpflanzen Merkmale xerophytischen Charakters (Xerophyten: Pflanzenarten, die Perioden starken und andauernden Wassermangels vegetativ überdauern können [Borriss et al., 1985]). Manche Blattarten, wie z.B. *Cordaites*, *Neuropteris* und *Mariopteris* können derb und etwas ledrig gewesen sein. Dieser scheinbare Widerspruch zwischen dem feuchtem Klima im Karbon und den xerophytischen Charakteren einiger Karbonpflanzen kann durch den Vergleich mit heutigen tropischen Regenwäldern aufgelöst werden. Diese können mit einigen Abstrichen mit den karbonischen Steinkohlewäldern verglichen werden (die Steinkohlewälder waren nicht so beblättert und gaben daher weniger Schatten als heutige Regenwälder). So tragen die hohen Bäume heutiger Regenwälder lederartige, derbe Blätter zum Schutz gegen die starke Sonnenstrahlung, während die Bodenflora feuchtigkeitsliebende, zartlaubige Gewächse wie Farne und Farnbäume ausbildet [Gothan et al., 1976]. Damit kann die Ausbildung xerophytischer Merkmale bei einigen Pflanzen der Steinkohlewälder als eine Anpassung an die hohen Lichtintensitäten verstanden werden. Weiterhin ist anzunehmen, daß der Anteil der lichtabsorbierenden Pigmente (Chlorophylle) im Blattgewebe der Karbonpflanzen geringer war als bei heutigen Pflanzen. Auch wird die Zusammensetzung der Pigmente der frühen Landpflanzen eine andere gewesen sein als heute. Die Blätter waren höchstwahrscheinlich nicht besonders grün (eher gelbgrün bis grüngelb). Vermutlich war die Ultrastruktur der Thylakoidmembranen in den Chloroplasten zu Beginn der terrestrischen Photosynthese nicht so in Grana- & Stromathylakoide differenziert wie heute. Diese lagen im Chloroplasten wahrscheinlich in einfachen Schichtungen vor. Eine solche einfache Schichtung der Thylakoidmembranen findet man auch bei der chlorophyllarmen Tabakmutante *Nicotiana tabacum Aurea* wieder, die hohe Lichtintensitäten benötigt, um gut zu gedeihen [Schmid und Gaffron, 1967]. Die Ausbildung des Thylakoidmembransystem in Grana- & Stromathylakoide ist

möglicherweise mit der zunehmenden Expression der LHC-Gene als Anpassungserscheinung auf eine Veränderung der Lichtintensität und -qualität im Laufe der Evolution der terrestrischen Pflanzenwelt zu verstehen, da die terrestrische Photosynthese vermehrt O₂ in die Atmosphäre einspeiste. Das Verhältnis von photochemischen Reaktionszentren zu LHC lag daher bei den ersten Pflanzen auf der Seite der Reaktionszentren (falls ein LHC überhaupt vorhanden war), da zu Beginn der terrestrischen Photosynthese (Mitte bis Ende des Paläozoikums) der Selektionsdruck in einer vorsichtigen Aufnahme von Lichtenergie lag. Denn aufgrund der hohen und noch harten Lichtstrahlung bestand die Gefahr einer photochemischen Schädigung des Photosynthese-Apparates und anderen Zellkomponenten. Erst mit der rasanten Ausbreitung der Pflanzen auf den Landmassen der Erde stieg die Konzentration an O₂ in der Atmosphäre deutlich an und erreichte vor 100 Millionen Jahre die heutige Konzentration (am Ende des Mesozoikums, mittlere Kreidezeit) [Böger, 1980]. Die starke Zunahme der Steinkohlewälder vor über 350 Millionen Jahren führte dann zu einem extremen Abfall der CO₂-Konzentration auf nahezu die heutigen Werte. Dies hatte einen großen Einfluß auf das globale Klima der Erde. Einige Autoren sehen darin den Grund für die große *permo-karbonische* Vereisung auf der Südhalbkugel der Erde [Berner, 1997]. Zu Beginn des Trias (vor 248 Millionen Jahren) stieg die CO₂-Konzentration wieder auf das fünffache der heutigen Konzentration an. Dies und die Bildung des Superkontinents Pangea hat zu einer Erwärmung der Temperatur in der Atmosphäre geführt (Kontinentalklima). Die zuvor dominierenden samenlosen Gefäßpflanzen der Steinkohlewälder wurden von den Gymnospermen, die mit der zunehmenden Trockenheit auf der Erde besser zurecht kamen, verdrängt. Zu Beginn des Mesozoikums (vor 248 Millionen Jahren) war die heutige Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre noch nicht erreicht. Die immer mehr dominierenden Gymnospermen wurden wahrscheinlich daher noch mit hohen Lichtintensitäten und kleineren und damit energiereicheren Wellenlängen konfrontiert. Mit der zunehmenden Konzentration an O₂ in der Atmosphäre ist es dann auch zu einem Anstieg an Ozon in der Atmosphäre gekommen. Die Ausbildung der Ozonschicht in der Atmosphäre hatte seinerseits einen entscheidenden Einfluß auf das Spektrum des einfallenden Sonnenlichtes: Der Anteil der sehr kurzwelligen Strahlung im Spektrum des Lichtes wurde kleiner und es fiel auch die Lichtintensität der Sonnenstrahlung ab. Der Selektionsdruck auf die Pflanzen verschob sich in Richtung verbesserter Lichtabsorption. Für die phototrophen Organismen ergab sich damit die Notwendigkeit, in steigendem Maße Licht aus dem sichtbaren Bereich zu nutzen. Als Folge der veränderten Sonnenstrahlung änderte sich die Pigmentzusammensetzung der Photosysteme [Sengbusch, 1989]. Nun traten je nach geographischer Lage der Pflanzen immer mehr Lichtsammel-Antennenkomplexe (LHC) in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten auf. Wie schon bereits erwähnt, kam es dabei wohl zu einer immer stärkeren Differenzierung des Lamellarsystems der Thylakoidmembranen in Grana- & Stromathylakoide, um den veränderten Licht- und Temperaturbedingungen Rechnung zu tragen. Die Folge war, daß der Anteil der lichtabsorbierenden Pigmente (Chlorophylle) im Blattgewebe mit der Abnahme der Lichtintensität immer mehr

zugenommen hat. Erst seit dem Tertiär fiel die CO_2 -Konzentration kontinuierlich auf das heutige Niveau ab. Dieser Abfall hatte einen Einfluß auf das globale Klima der Erde. Denn seit dem Beginn des Pleistozän (vor 2,5 Millionen Jahren) war die dynamische Komponente des Klimas immer weiter angestiegen, so daß die zuvor noch eisfreien Polarregionen vereisten und wiederholte Wechsel von Kalt- und Warmzeiten auftraten.

Im Verlauf der Evolution der terrestrischen Photosynthese hat es also große klimatische Veränderungen gegeben, die zum Teil durch die oxygenen Photosynthese selbst hervorgerufen wurden. Geologische Prozesse wie die Kontinentalverschiebung trugen ebenfalls zur Klimabildung und -veränderung bei. Der Vergleich der klimatischen Verhältnisse der letzten 2,5 Millionen Jahre mit den vorhergehenden 460 Millionen Jahre macht deutlich, daß die Evolution der terrestrischen Pflanzenwelt bisher überwiegend unter wesentlich höheren CO_2 -Partialdrücken, unter deutlich höheren Temperaturen und unter stärkeren Lichtintensitäten stattgefunden hat. Es stellt sich daher die Frage, ob eine Anzucht von normal grün ausgebildeten Pflanzen in einer erhöhten CO_2 -Atmosphäre in diesen eine Art *Erwartungshaltung* erzeugt, die davon ausgeht, daß die Lichtintensität ebenfalls erhöht werden wird. Gibt es bei den terrestrischen Pflanzen eine, möglicherweise durch die bisherige Evolution bedingte, wie auch immer geartete (genetische?) Kopplung zwischen der CO_2 -Konzentration und der Lichtintensität?

1.7 Aufgabenstellung:

In dieser vorliegenden Arbeit wurden die langzeitlichen Anpassungen der Lichtreaktionen der Photosynthese Höherer Pflanzen an eine erhöhte CO_2 -Atmosphäre von 700 ppm untersucht. Hierfür wurden die Tabakpflanzen *Nicotiana tabacum* John William's Broadleaf und deren natürliche chlorophyllarmen Mutante Su/su, beide C_3 -Pflanzen, eingesetzt.

Die *CO₂-Pflanzen* wuchsen neben den Kontrollanzuchten in einer Klimakammer in Glaskammern auf, die mit CO_2 -Gas konstant begast wurden (700 ppm CO_2). Temperatur und Lichtverhältnisse wurden nicht verändert!

Es wurde die Veränderung des Wachstumsverhaltens der Blätter, die Protein- und die Pigmentkonzentration, sowie der Pigmentverteilung im Photosynthese-Apparat der beiden Tabakpflanzen untersucht. Desweiteren interessierte die Veränderung der Polypeptidzusammensetzung des Photosynthese-Apparates und die Auswirkung auf die photosynthetische Aktivität.

Zur Untersuchung der **Anpassungserscheinungen des Photosyntheseapparates** der beiden Tabakpflanzen auf eine erhöhte CO₂-Konzentration in der Versuchsatmosphäre wurden/e :

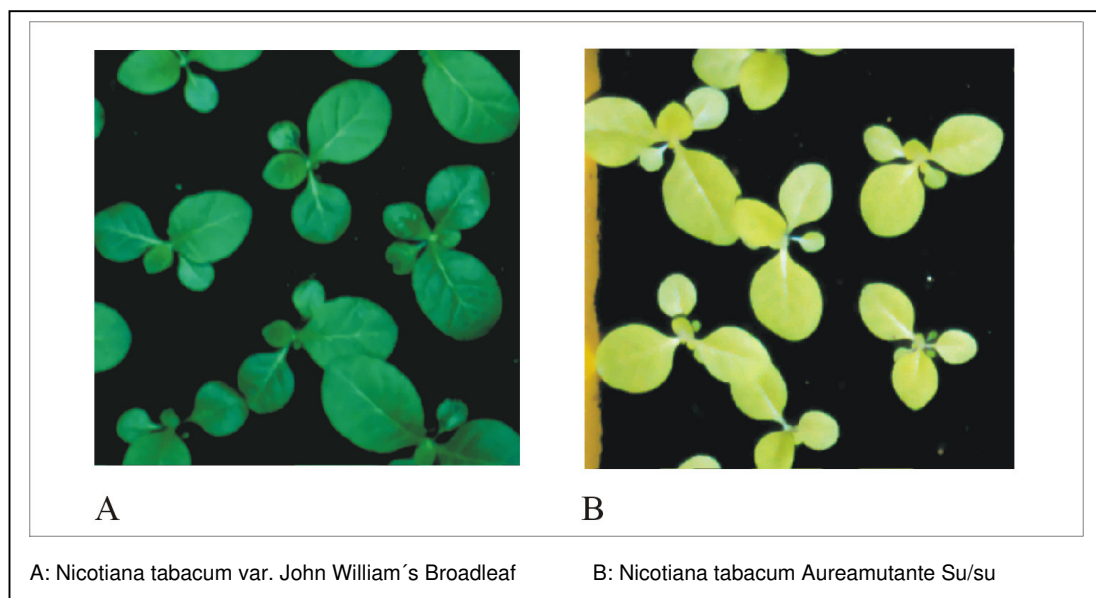
- a) das Wachstumverhalten der beiden Tabakpflanzen (Blattflächenwachstum) aufgezeichnet.
- b) die Protein- und Pigmentkonzentration von Blattstücken, Chloroplasten, Thylakoidmembranen, Photosystem II-Membranen und von Photosystem I-Komplexen bestimmt.
- c) die Pigmentverteilung isolierter Thylakoidmembranen mittels der HPLC analysiert.
- d) die Konzentration an Plastochinon in isolierten Thylakoidmembranen mittels der HPLC analysiert.
- e) die Fettsäuren isolierter Thylakoidmembranen mit der Methode der Gaschromatographie analysiert
- f) Analysen der Peptidzusammensetzung isolierter Thylakoidmembranen, Photosystem II-Membranen und Photosystem I-Komplexen mit SDS-Gelelektrophorese durchgeführt.
- g) eine halbquantitative Bestimmungen einzelner Polypeptide des Photosyntheseapparates isolierter Thylakoidmembranen mittels monospezifischer polyklonaler Antiseren im Westernblot (Immunoblot) durchgeführt.
- h) die Fluoreszenz dunkeladaptierter Blätter und Chloroplasten mit und ohne chemische Zusätze analysiert.
- i) vergleichende physiologische Untersuchungen zur photosynthetischen Aktivität von Blattstücken mit der Warburg-Manometrie und von Chloroplasten, Photosystem II-Membranen (PSII-Membranen) und Photosystem I (PS I) -Komplexen mit Hilfe der Clark-Sauerstoff-Elektrode in Abhängigkeit von der Lichtintensität und der Temperatur durchgeführt.
- j) vergleichende Bestimmung des P700 Signals von Chloroplasten und PSI-Komplexen mit P700-Absorptionsspektroskopie, sowie die chemische Bestimmung des Verhältnisses Chlorophyll zu P700 bei isolierten PSI-Komplexen durchgeführt.

2. Material und Methode

2.1. Versuchsobjekte

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde die Tabaksorte *Nicotiana tabacum* var. *John William's Broadleaf* (JWB) und deren chlorophyllarmen Mutante Su/su, das ist eine dominante Aurea-Mutante, die zuerst von Burk und Menser [1964] beschrieben wurde, verwendet (siehe Abb. 2.1 A & B).

Abbildung 2.1 Junge Pflanzen von *Nicotiana tabacum* var. JWB & Aureamutante Su/su.



Die Blätter des Wildtyps (JWB) weisen eine dunkelgrüne Blattfärbung auf. Die Struktur der Chloroplasten ist, charakteristisch für Höhere Pflanzen, in Grana- und Stromathylakoide differenziert.

Die chlorophyllarme Tabakmutante Su/su hat grüngelbe Blätter. Ihre Chloroplasten besitzen im Vergleich zum Wildtyp JWB eine einfachere Chloroplastenstruktur. Die Anzahl der gestapelten Membranen in den Granathylakoiden der Chloroplasten ist bei der Mutante erheblich geringer. Die Mutante Su/su ist durch eine Verkleinerung der Lichtantenne, d.h. durch eine Reduzierung des Licht-Sammel-Antennen-Komplexes (LHC) in den Thylakoidmembranen charakterisiert [Schmid und Gaffron, 1967].

2.2. Anzuchtbedingungen

Die verwendeten Tabaksorten *Nicotiana tabacum* var. *John William's Broadleaf* (JWB) und *Nicotiana tabacum* var. *Aurea* (Su/su) wurden in Klimakammern angezogen.

Die Bedingungen in der Klimakammer sind:

Temperatur: Tag / Nacht: 27 ° C / 21 ° C, Luftfeuchtigkeit: 50 - 60 %,
Lichtintensität: 120 - 160 $\mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$,
Leuchtstofflampe: Sylvania, F96 T 12/GRO/VHO/WS (Lichtfarbe: GRO-LUX),
Tag / Nacht Zyklus: 14 / 10 h

2.2.a CO₂-Begasung

Neben den Kontrollpflanzen, die unter dem atmosphärischen CO₂-Druck von 350 ppm aufwuchsen, wuchsen CO₂-Pflanzen in den beiden Klimakammern in geschlossenen Glassbehältern auf, die kontinuierlich mit CO₂ begast wurden. Eine oder zwei zwischen geschaltete Pumpen sorgten für eine gleichmäßige Verteilung des CO₂ in den Glassbehältern. Die CO₂-haltige Abluft wurde über einen Schlauch aus den Klimakammern abgeleitet. Der CO₂-Druck in den Glasbehältern lag bei 0,07 Volumenprozent (700 ppm). Gemessen wurde der CO₂-Gehalt mit einem Meßröhrchensystem der Firma Dräger (Typ: Accuro 2000 mit den entsprechenden CO₂-Meßröhrchen mit einer Genauigkeit von $\pm 0,01$ %).

2.3. Chlorophyll- & Carotinoidbestimmung

Zur Bestimmung der Chlorophyllkonzentration wurde die Methode von G.H. Schmid [1971] herangezogen. Je nach Pigmentgehalt wurden 10 - 100 μl der chlorophyllhaltigen Proben bei Raumtemperatur so mit Methanol und bidestilliertem Wasser versetzt, daß stets eine 90%ige Methanol/Wasser-Lsg. (V/V) entstand (Volumen: 10 ml). Nach einer fünfminütigen Extraktion bei Zimmertemperatur im Dunkeln wurden vorhandene Schwebstoffe abzentrifugiert (Heraeus-Minifuge, 2 min. bei 2000 x g).

Zur Bestimmung des Chlorophyll- & des Carotinoidgehaltes in den Blättern der beiden Tabakpflanzen wurde ein Blattstück von 1 - 2 cm² Größe in Methanol über 24 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur extrahiert. Erschienen die Blattstücke nicht vollständig farblos, wurden sie für 20 min. auf 60° Celsius erhitzt. Die Methanol-Lsg. wurde dann mit Wasser so eingestellt, daß eine 90%ige Methanol/Wasser-Lsg vorlag. Vorhandene Schwebstoffe wurden in der Heraeus-Minifuge abzentrifugiert (2 min. bei 2000 x g).

Die Extinktion des Überstandes wurde gegen 90%iges Methanol (V/V) bei 663 nm, 645 nm und bei 430 nm in einem Zeiss Spektralphotometer PM 6 gemessen.

Berechnung des Chlorophyll- & Carotinoidgehaltes in den Proben:

Chlorophyllberechnung:

Nach Schmid gilt [1971]:

$$\text{Chl. a} = \frac{(\text{Ext.}_{663 \text{ nm}} \times 45,6) - (\text{Ext.}_{645 \text{ nm}} \times 9,27)}{3585,75} \times 1,16 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\text{Chl. b} = \frac{(\text{Ext.}_{645 \text{ nm}} \times 82,04) - (\text{Ext.}_{663 \text{ nm}} \times 16,75)}{3585,75} \times 1,07 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\text{Gesamtchlorophyll (mg / ml)} = \text{Chl.a (mg / ml)} + \text{Chl.b (mg / ml)}$$

Carotinoidberechnung:

Die Carotinoide haben bei 430 nm eine deutliche Absorption. Dies trifft jedoch auch für die beiden Chlorophylle **a** und **b** zu. Um den Anteil der Chlorophyllabsorption bei 430 nm abziehen zu können, muß vorher die Chlorophyllkonzentration in der zu messenden Probe bestimmt werden.

Nach Schmid gilt:

13 µg Chlorophyll ergeben in 1ml Volumen bei 430 nm eine Extinktion von 0,5.

Die gemessene Extinktion bei 430 nm abzüglich der berechneten Chlorophyllabsorption bei 430 nm ergibt die Carotinoidabsorption. Diese wird über eine Eichgerade in µg / ml umgerechnet.

Die Formel lautet:

$$0,5 : \left\{ 0,013 : \left\{ \frac{\text{Gesamtchlorophyllgehalt}}{\text{Verdünnungsfaktor}} \right\} \right\} = \text{Carotinoidabsorption bei 430 nm}$$

Mit dem Gesamtchlorophyllgehalt ist die Konzentration (mg / ml) an Chlorophyll **a** und **b** in der Probe gemeint. Diese wird zur Bestimmung der Chlorophyll- und Carotinoidkonzentration verdünnt. Der Verdünnungsfaktor gibt die entsprechende Verdünnung der Probe wieder.

Die Geradengleichung der Eichgerade lautet:

$$x = y \times 4,76 \quad , \text{ dabei ist } x \text{ gleich } \mu\text{g Carotinoide / ml} \quad \text{und} \\ y \text{ die Carotinoidektinction (430 nm)}$$

2.4. Isolierung des Versuchsmaterials

Für die Isolierung jeglichen Versuchsmaterials gilt:

1. Es wurde stets bei 4° C (Kühlkammer) oder auf Eis gearbeitet.
2. Es wurde bei gedämpften Licht oder im Dunkeln gearbeitet.

2.4.1. Isolierung von photosynthetisch aktiven Chloroplasten

Die Präparation von photosynthetisch aktiven Chloroplasten erfolgte in modifizierter Form nach der Methode von Homann und Schmid [1967].

Alle Präparationsschritte wurden bei 4° C oder auf Eis durchgeführt.

Nach dem Ernten der Blätter wurden diese gewaschen und die Mittelrippe entfernt. In einem Mörser wurden die Blattstücke mit Seesand und **Chloroplastenaufschlußpuffer** auf Eis sehr schnell zerrieben, der entstandene Brei durch acht Lagen Mulltuch filtriert und das Homogenat einer fraktionierten Zentrifugation unterworfen.

Die Aufarbeitung erfolgte nach dem Schema:

1. Zentrifugation bei 600 x g für 1 min in der Heraeus Minifuge., Entfernung des Seesandes und der Zelltrümmer
2. Zentrifugation des Überstandes bei 3000 x g, 10 min.
3. Resuspendierung des Sedimentes in **Chloroplastenaufschlußpuffer** (20 % des Ausgangsvolumen)
4. Zentrifugation der Suspension bei 3000 x g, 5 min.
5. Resuspendierung des Sedimentes in **Chloroplastenaufschlußpuffer** (10 % des Ausgangsvolumen)
6. Zentrifugation der Suspension bei 600 x g, 1- 2 min., Entfernung der Stärke

Der Überstand enthält photosynthetisch aktive Chloroplasten, die sofort einer Chlorophyll- und Aktivitätsmessung zugeführt wurden.

Verwendete Lösungen für die Chloroplastenisolierung:

Chloroplastenaufschlußpuffer:	50 mM	Tris
	10 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂
	400 mM	Sucrose
	5- 10 mM	Pefalbloc SC (Proteaseinhibitor), Firma Merk

mit HCl auf pH: 7,8 einstellen.

2.4.2. Isolierung von Thylakoidmembranen

Zur Isolierung von Thylakoidmembranen wurden die unter **2.4.1.** isolierten Chloroplasten folgendermaßen aufgearbeitet.

1. Zentrifugation der Chloroplastensuspension bei 3000 x g für 5 min in der Heraeus Minifuge.
2. Resuspendierung des Sedimentes in **Hepes 1 Puffer** (20 - 30 % des Ausgangsvolumen).
3. Zentrifugation der Suspension bei 4000 x g, 5 min.
4. Resuspendierung des Sedimentes in **Hepes 1 Puffer** (10 % des Ausgangsvolumen).
5. Zentrifugation der Suspension bei 4000 x g, 5 min.
6. Resuspendierung des Sedimentes in **Hepes 2 Puffer** (10 % des Ausgangsvolumen). Die Resuspendierung der Chloroplasten in **Hepes 2 Puffer** bewirkt, daß die Chloroplasten aufplatzen.
7. Zentrifugation der Suspension bei 4000 x g, 5 min.
8. Resuspendierung des Sedimentes in wenig **Hepes 2 Puffer**
9. Zentrifugation der Suspension bei 600 x g, 1- 2 min. Entfernung der Stärke.

Der Überstand enthält photosynthetisch aktive Thylakoidmembranen, die auf 1 mg Chlorophyll / ml eingestellt und dann portionsweise bei - 20° C eingefroren wurden.

War nach dem 7. Schritt der Überstand noch grünlich gefärbt , so wurden bis zur Klärung des Überstandes weitere Waschungen mit **Hepes 2 Puffer** (Punkt 6. & 7.) durchgeführt.

Diente die Thylakoidsuspension als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von PS II-Membranen, so wurde der pH-Wert der betreffenden **Hepes Puffer** (1 & 2) auf 6,5 eingestellt. Für die Isolierung von Thylakoidmembranen, die nicht als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von PS II-Membranen dienten, lag der pH-Wert der Hepes Puffer bei 7,25.

Für die Isolierung der Thylakoidmembranen verwendete Lösungen:

Hepes 1 Puffer:	20 mM	Hepes
	5 mM	MgCl ₂
	15 mM	NaCl
	5- 10 mM	Pefalbloc SC (Proteaseinhibitor)

mit NaOH auf pH: 6,5 einstellt.

Hepes 2 Puffer:	20 mM	Hepes
	5 mM	MgCl ₂
	15 mM	NaCl
	5- 10 mM	Pefalbloc SC (Proteaseinhibitor)

mit NaOH auf pH: 6,5 einstellt.

2.4.3. Isolierung von Photosystem II Membranen

Für die Isolierung von Photosystem II (PS II)-Membranen wurde die Methode von Berthold et al. [1981] in modifizierter Form angewendet. Als Ausgangsmaterial zur Isolierung von PS II-Membranen werden isolierte Thylakoidmembranen benötigt.

Die Herstellung photosynthetisch aktiver Thylakoidmembranen erfolgte wie unter Punkt 2.4.2. beschrieben. Für den Aufschluß des Blattmaterials wurde ein Mixer (Braun MX 32) verwendet.

Nach der Resuspendierung der Thylakoidmembranen in wenig **Hepes 2 Puffer** (Punkt 2.4.2., Unterpunkt 8), wurde der Chlorophyllgehalt bestimmt und die Suspension auf 2mg Chlorophyll / ml eingestellt. Folgendes Schema beschreibt die weiteren Präparationsschritte.

1. Nachdem die Thylakoidsuspension auf 2mg Chlorophyll / ml (**Hepes 2 Puffer**) eingestellt wurde, folgte die erste Detergenzinkubation der Thylakoidsuspension mit Triton X-100 (20 mg Triton X-100 / mg Chlorophyll, Stammlösung Triton X-100: 25% (W/W)) im Dunkeln. Die Inkubationszeit betrug 1- max. 5 min. (In den heißen Sommermonaten betrug die Inkubationszeit 1 min., während sie im Winter bei 5 min. lag.).
2. Zentrifugation der mit Triton X-100 versetzten Thylakoidsuspension bei 4000 x g für 5 min. in der Heraeus Minifuge.

3. Zentrifugation des Überstandes bei 35000 x g für 30 min in einer Sorval RC-5B oder Sorval RC28S.

Nach der ersten Detergenzbehandlung der Thylakoidsuspension sollte nach der Zentrifugation bei 4000 x g für 5 min. ein Pellet vorhanden sein. Ist dies nicht der Fall, so hat die Detergenz die Thylakoidmembranen völlig aufgelöst. Dies bedeutet, daß die Thylakoidmembranen so stark zerstört (aufgelöst) wurden, daß kaum noch Membranstücke vorhanden waren, die bei 4000 x g abzentrifugiert werden können. Es hatte sich gezeigt, daß in einem solchen Fall auch nur noch sehr wenig PS II-Membranen vorhanden sind, die bei 35000 x g abzentrifugiert werden konnten. In diesem Fall ist die Präparation von Anfang an zu wiederholen.

4. Resuspendierung des Sedimentes in **Hepes 2 Puffer** bis zu einer Chlorophyllkonzentration von 2 mg Chl. / ml.
5. Zweite Detergenz Zugabe mit Triton X-100 (5 mg Triton X-100 / mg Chlorophyll) ohne Inkubationszeit.
6. Sofortige Zentrifugation der Suspension bei 35000 x g für 30 min. in der Sorval RC-5B oder Sorvall RC28S.
7. Resuspendierung des Sedimentes in **Hepes 2 Puffer**.
8. Zentrifugation der Suspension bei 35000 x g für 30 min..
9. Wiederholung der Waschschrte 7 und 8.
10. Nach dem letzten Waschschrte sollte der Überstand klar sein. Das Sediment, welches die PS II-Membranen enthält, wurde in **Hepes 2 Puffer** resuspendiert und auf 1 mg Chlorophyll / ml eingestellt.

Die PS II-Membranfraktion wurde portionsweise bei - 20° C eingefroren oder einer sofortigen Aktivitätsmessung zugeführt.

2.4.4. Photosystem I Präparation

Für die Isolierung von photosynthetisch aktiven Photosystem I (PS I) -Komplexen wurde die Methode von Wynn & Malkin [1988] in leicht modifizierter Form angewendet.

Als Ausgangsmaterial diente die Chloroplastenpräparation wie unter Punkt **2.4.1** beschrieben.

Die folgende Aufzählung beschreibt die Präparationsschritte zur Isolierung der PS I-Komplexe.

1. Die aus Punkt **2.4.1** gewonnene Chloroplastensuspension wurde bei 3000 x g (10 min.) abzentrifugiert (Heraeus Minifuge).
2. Das Chloroplastenpellet wurde in 100 mM NaCl (gelöst in 20 mM Tris-Cl, pH: 7.8) resuspendiert und 10 min. im Dunkeln auf Eis inkubiert. Dadurch platzen die Chloroplasten auf und das im Chloroplasten befindliche Lamellarsystem (Thylakoide) wird freigesetzt.

3. Zentrifugation der so behandelten Chloroplastensuspension bei 4000 x g für 10 min. in der Heraeus Minifuge zur Gewinnung der Thylakoide.
4. Resuspendierung des Sedimentes (Thylakoide) in 2 M NaBr, gelöst in **Chloroplastenaufschlußpuffer**. Dies führt zur Ablösung der CF₁-Komponente des ATP-Synthase-Komplexes von den Thylakoidmembranen.
5. Inkubation der Thylakoide unter leichtem Rühren im Dunkeln und im Eisbad für 30 min..
6. Zugabe des gleichem Volumens **Chloroplastenaufschlußpuffer** ohne NaBr.
7. Zentrifugation der Suspension bei 4000 x g für 20 min. in einer Heraeus Minifuge.
8. Resuspendierung des resultierenden Pellets in **Chloroplastenaufschlußpuffer** zur Entfernung des NaBr und anschließende Zentrifugation bei 4000 x g für 5 min. in der Heraeus Minifuge.
9. Wiederholung des vorhergehenden Waschschrilles.

Das Pellet enthält mit NaBr behandelte Thylakoidmembranen.

10. Resuspendierung des Pellets in 50 mM Tris-Cl, pH: 7,8. Der Chlorophyllgehalt wird dabei auf 1 mg Chlorophyll / ml eingestellt.
11. Zugabe an **Triton X-100** (25%ige Stammlösung, (W/W)) bis zu einer Endkonzentration von 1 % (W/V).
12. Inkubation der detergentenhaltigen Thylakoidsuspension unter leichtem Rühren im Dunkeln auf Eis für 1 Stunde.
13. Zentrifugation der Suspension bei 47000 x g für 30 min. in der Sorval RC28S.

Der Überstand enthält natives PS I (Reaktionszentrum + LHC) + Verunreinigungen (PS II-Peptide, Peptide des ATP-Synthase Komplexes).

14. Der Überstand aus der 47000 x g Zentrifugation mit den nativen PS I-Komplexen wurde auf einen linearen Sucrose-Dichte-Gradienten (0,4 Mol - 1Mol Sucrose, gelöst in 50 mM Tris-Cl, pH: 7,8 mit 0,02 % Triton X-100 (W/V)) geschichtet. Der Sucrose-Dichte- Gradient lag auf einer 2 molaren Sucroseschicht.
15. Es folgte eine Ultrazentrifugation im Beckmann SW-27 Rotor für 20 Stunden bei 80.000 x g, oder falls möglich für 15 Stunden bei 100.000 x g (Temperatur: 4° C).

Volumengröße der Röhren: 38 ml max.

Volumengröße des Sucrosegradient: 30 ml einschließlich der 2 molaren Sucroseschicht

Aufgabe von 47000 x g Überstand: 6,5 - max. 8 ml

Gesammelt wurde die dunkelgrüne Bande zwischen der 1 - und 2 molaren Sucroseschicht.

Die aus der Sucrose-Dichte-Gradientenzentrifugation anfallenden PS I-Komplexe wurden mehrmals gegen 50 mM Sorbitol, gelöst in 50 mM Tris-Cl, pH 7,8, bei 4° C dialysiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 100.000 x g für 1 Stunde (Sorval RC28S). Das Pellet mit der PS I-Fraktion wurde in 50 mM Tris-Cl, pH 7,8 resuspendiert und die Chlorophyllkonzentration auf 1 mg Chlorophyll / ml eingestellt.

2.5. Proteinbestimmung

2.5.1 Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure [Smith et al., 1985]

Für die Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure wurden die folgenden Lösungen verwendet:

A:	1	%	Bicinchoninsäure
	2	%	Na ₂ CO ₃ x H ₂ O
	0,16	%	Na-Tartrat
	0,4	%	NaOH
	0,95	%	NaHCO ₃
B:	4	%	CuSO ₄ x 5 H ₂ O

1 ml der Lösung **B** (4 % CuSO₄) wurde mit 50 ml der Lösung **A** (Bicinchoninsäure) versetzt. Die entstandene Lösung **C** zeigte eine grüne Färbung. In 2 ml der Lösung **C** wurden 100 µl Probe gelöst. Es folgte eine Inkubation bei 30° C für 30 min.. Dann wurde die Extinktion der Ansätze bei 562 nm gemessen. Mit Hilfe einer Eichgeraden mit Rinderserumalbumin (10- 100 µg Protein) konnte der Gehalt an Protein in der Probe bestimmt werden.

2.5.2. Proteinbestimmung mit Neßler's Reagenz [Williams, 1968]

Lösungen: käufliche Neßler Lösung A und B der Firma Merck
Die gebrauchsfertige Lösung wurde aus Lösung A und B im Verhältnis 1:1 hergestellt.

H₂SO₄-Lsg.: H₂SO₄ (Konzentriert) + H₂O im Verhältnis 1: 1,2

Die Bestimmung der Proteinkonzentration mit Neßler's Reagenz erfolgte über folgende Arbeits-schritte:

1. 100 µl Probe wurden mit 200 µl der H₂SO₄-Lsg. vermischt. Bei Blattmaterial wurde ¼ cm² Blatt mit 200 µl H₂SO₄-Lsg. versetzt.
2. Die mit der H₂SO₄-Lsg. versetzten Proben wurden für 1h erhitzt (Heizplatte Stufe 3).
3. ½ h abkühlen.
4. Zugabe von 2 Tropfen H₂O₂ (Stammlösung: 30 %).
5. ½ h erhitzen (Heizplatte Stufe 3). Die Proben sollten nach der Inkubation mit H₂O₂ klar sein.
6. ¼ h abkühlen.
7. Zugabe von 4,8 ml H₂O.
8. Zugabe von Neßler's Reagenz (Lsg. A + Lsg. B im Verhältnis 1:1) : 2 ml (gut schütteln).
9. Messung der Extinktion bei 440 nm in Glasküvetten.

Die Bestimmung des Proteingehaltes in den Proben oder Blattstücken erfolgte mit Hilfe einer Eichgeraden mit Rinderserumalbumin (10- 100 µg).

2.6. Wachstumskurve

Das Flächenwachstum der Blätter wurde durch Planimetrie bestimmt. Die Umrisse der Blätter wurde auf Safir Millimeterzeichenpapier übertragen, herausgeschnitten und abgewogen. Die Fläche wurde über eine Eichgerade bestimmt. Hierzu wurden verschieden große Papierstücke (Safir Millimeterzeichenpapier, 80/85/g/cm²) mit genau definierter Fläche (0,5- 100 cm²) abgewogen.

Zur Bestimmung der Wachstumskurve wurden jeweils die zweiten Blätter nach den beiden Keimblättern herangezogen. Es wurde das Mittel aus je 6 Einzelmessungen berechnet.

2.7. Lipidanalyse der Thylakoidmembranen

2.7.1 Isolierung der Lipide

Als Ausgangsmaterial zur Isolierung der Lipide dienten *Kontroll- & CO₂-Thylakoide* von *Nicotiana tabacum var. John William's Broadleaf* (JWB, 28 Tage) und *Nicotiana tabacum Mutante Su/su* (35 Tage).

Die Ausgangsmenge zur Isolierung der Lipide entsprach beim Wildtyp JWB auf Chlorophyll bezogen jeweils 22 mg. Bei der Mutante Su/su entsprach die eingesetzte Menge der Thylakoidpräparation der *Kontrollpflanzen* auf Chlorophyll bezogen 10 mg. Bei den CO₂-

Pflanzen der Tabakmutante Su/su wurde auf Chlorophyll bezogen 20 mg der Thylakoidpräparation verwendet.

Die Thylakoidsuspension wurde tropfenweise in kochendes Ethanol gegeben, 2-3 min. gekocht, in Eiswasser abgekühlt und der gesamte Ansatz auf eine Glasfritte (0,5 µm) gegeben. Die durchlaufende Ethanollsg. wurde in einem 500 ml Rundkolben aufgefangen. Anschließend wurde unter dem Abzug mit je 60 ml Methanol, Aceton und Diethylether (peroxidfrei) nach-extrahiert. Der Extrakt wurde im Vakuum-Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt und mit einem Chloroform / H₂O Gemisch im Verhältnis 1:1 mehrmals (mindestens jedoch zweimal) ausgeschüttelt. Dabei wurden die Chloroformphasen zusammengefaßt und im Vakuum-Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt, während die Wasserphase mit den noch vorhandenen Proteinen verworfen wurde. Nachdem die Lipide in 50 ml Diethylether aufgenommen waren, folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 4000 x g (Heraeus Minifuge). Der Überstand enthielt die etherlöslichen Lipide. War nach der Zentrifugation Sediment vorhanden, so wurde dieses nochmals in Ether aufgenommen und wiederum bei 4000 x g abzentrifugiert. Die Diethyletherüberstände wurden vereinigt, im Vakuum-Rotationsverdampfer bis auf wenige ml eingengt und in einen 50 ml Rundkolben, der zuvor mit CO₂ gefüllt gewogen wurde, überführt. Dann wurde der restliche Ether bis zur Trockene abdestilliert und das Präparat im Exikator über Blaugel und Vakuum endgültig getrocknet. Nachdem der Rundkolben wiederum mit CO₂ gefüllt war, wurde dieser gewogen. Durch Abzug des Bruttogewichtes von dem Nettogewicht des Rundkolben konnte die Menge an isolierten Lipiden bestimmt werden. Anschließend wurden die Lipide in Toluol bis zu einer Endkonzentration von 20 mg Lipide / ml Toluol gelöst.

2.7.2. Test auf die Reinheit der isolierten Thylakoidmembranen:

Ausschluß der Kontaminierung der Lipidfraktion durch Phosphatidylethanolamin.

Der Chlorophyllgehalt in den Lipidextrakten wurde nach G.H. Schmid [1971] bestimmt. Für die Bestimmung einer möglichen Kontaminierung mit Phosphatidylethanolamin wurde die Dünnschichtchromatographie eingesetzt. Denn das Phosphatidylethanolamin ist im Lamellarsystem der Thylakoidmembranen nicht enthalten [M. Frentzen und E.Heinz, 1983]. Damit kann getestet werden, ob die isolierten Thylakoidmembranen auch wirklich rein sind. Hierfür wurden DC-Alufolien der Firma Merck, beschichtet mit Kieselgel 60 F₂₅₄, benutzt. Als Laufmittel wurde ein Chloroform/Methanol/ Eisessig/ H₂O Gemisch von 85 ml / 15 ml / 10 ml / 3,5 ml (V/V) benutzt. Pro Lauf wurden jeweils 1 mg Lipide einer Lösung, die 20 mg Lipide / ml enthielt, eingesetzt. Zum Nachweis des möglicherweise vorhandenen Phosphatidylethanolamin wurden die DC-Aluplatten nach Beendigung des Laufes mit Ninhydrinreagenz besprüht.

Zusammensetzung des Lipid-Nachweißreagenz:

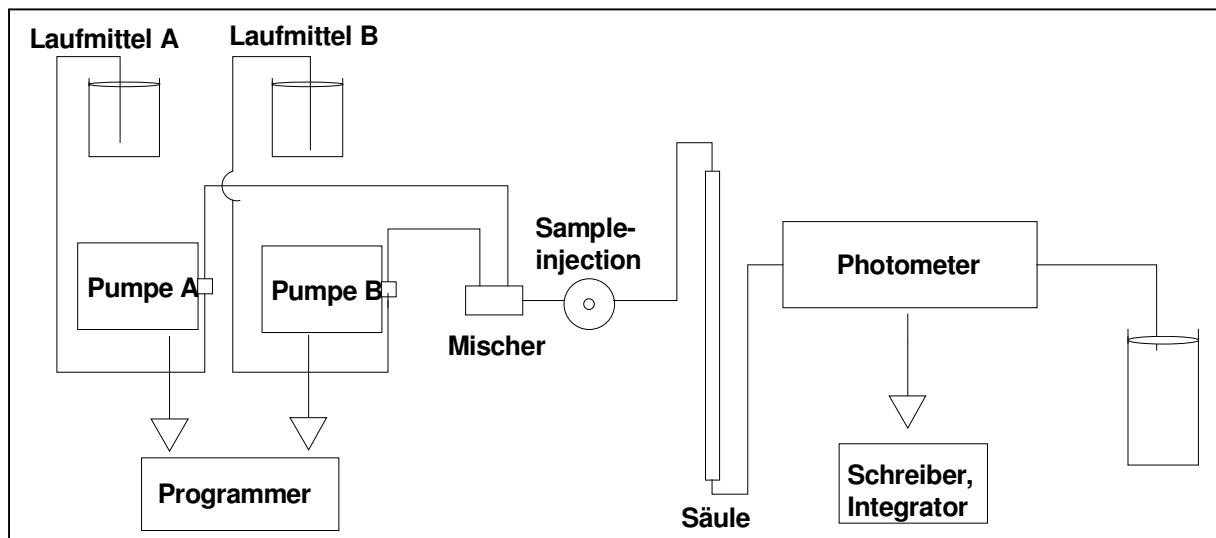
Ninhydrinreagenz : 0,2%ige Ninhydrinlsg. wird zur Markierung von Aminosäurehaltigen Phospholipiden wie Phosphatidylethanolamin eingesetzt. Test auf Reinheit der Thylakoidmembranen, da im Lipidextrakt kein Phosphatidylethanolamin nachgewiesen werden darf [M. Frentzen und E. Heinz, 1983].

2.7.3. Quantitative Plastochinon-Bestimmung mit High Pressure Liquid Chromatography (HPLC).

Die quantitative Plastochinon Bestimmung wurde nach der Methode von Hundal et al. [1985] durchgeführt. Die zu Verfügung stehende Apparatur hatte folgende Spezifikation:

Pumpen:	Firma Kontron, LC Pump 410
Programmer:	Firma Kontron, Model 200
Sample-Injection:	Rheodyne Model 7125
Detektor:	Spektralphotometer: Uvikon 720 LC, Firma Kontron
Säule:	RP 18, 5µm Korngröße, Firma Merk
Schreiber:	Firma Hewlett Packard, HP 3390 A Integrator

Aufbau:



Laufbedingungen:

90 % Methanol/ 10 % H₂O (Laufmittel A) wechselten linear in 20 Min. nach 80 % Methanol/ 20 % Isopropanol (Laufmittel B). Der Lauf wurde nach 40 min. beendet. Die Fließ-

geschwindigkeit wurde auf 1,5 ml / min. eingestellt. Der Peak des Plastochinon wurde spektralphotometrisch bei 210 nm gemessen.

Bei diesen Laufbedingungen eluiert das Plastochinon als letzter Peak von der Säule. Der RT-Wert liegt bei 33- 36 min.

Geeicht wurde mit einem Plastochinon der Kettenlänge $n = 10$ (Hoffmann-La Roche). Die Eichgerade zur Bestimmung des Plastochinon lautet:

$X = Y / 0,3755$, mit $Y = \text{Fläche (Area)}$ und $X = \text{Konzentration an Plastochinon in } \mu\text{g}$.

Proben: Gesamtlipidextrakt der *Kontroll- & CO₂-Thylakoidmembranen* der beiden Tabakpflanzen JWB und Su/su

Pro HPLC-Lauf wurden 60 μl des Gesamtlipidextraktes (etherlösliche Lipide) eingesetzt.

2.7.4. Isolierung von Carotinoiden und Fettsäuren aus dem Gesamtlipidextrakt

a. Isolierung der Fettsäuren aus dem Gesamtlipidextrakt der Thylakoidmembran

Zur Isolierung der Fettsäuren wurden jeweils 20 mg (entspricht 1 ml) etherlösliche Lipide (Gesamtlipidextrakt) und Carotinoide eingesetzt. Diese wurden im Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt, dann mit 50 ml 0,5 N methanolischer NaOH-Lsg. versetzt und zur Verseifung 1 Stunde unter Rückflußkühlung gekocht. Dann wurden der abgekühlten Lösung ca. 30- 40 ml H₂O zugegeben und mit ca. 30- 50 ml destilliertem Petrolether (Petroleumbenzin 50- 70° C) drei bis viermal im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Dabei gehen Kohlenwasserstoffe und Carotinoide in die Petroletherphase, während die Salze der Fettsäuren in der Mutterlauge (Methanolische NaOH + H₂O) verbleiben.

Die Mutterlauge wurde nach der Ausschüttelung mit Petrolether mit 25%iger HCL angesäuert. Durch die starke Herabsetzung des pH-Wertes in der Mutterlauge lösen sich die Salze der Fettsäuren auf und können nun ebenfalls mit Petrolether (Petroleumbenzin 50- 70° C) ausgeschüttelt werden. Dazu wurde die Mutterlauge mehrmals mit ca. 50 ml Petrolether im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Die vereinigten Petroletherphasen, welche die Fettsäuren enthielten, wurden durch mehrmaliges Ausschütteln mit H₂O neutralisiert, anschließend im Vakuum-Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt, in Ethanol gelöst, in einem 10 ml Spitzkolben, der zuvor mit CO₂ gefüllt ausgewogen wurde, überführt und im Vakuum-Rotationsverdampfer wieder bis zur Trockene eingengt. Zur endgültigen Trocknung der Fettsäuren wurden diese im Exsikator über Blaugel mehrere Stunden inkubiert. Dabei wurde der Exsikator an eine elektrische Vakuumpumpe angeschlossen. Dann wurde der 10 ml Spitzkolben wieder mit CO₂ gefüllt und ausgewogen, um die Menge an isolierten Fettsäuren

zu bestimmen. Die ausgewogenen Fettsäuren wurden in 200 µl Hexan gelöst. Um die Fettsäuren der gaschromatischen Analyse zuzuführen, wurden sie verestert. Dazu wurden zu den in 200 µl Hexan gelösten Fettsäuren 100 µl des TMSH (0,2 Mol Trimethylsulfoniumhydroxid in Methanol) -Reagenzes (Macherey & Nagel) zugesetzt und bei 100° C 10 min im Wasserbad inkubiert.

Die so behandelten Fettsäurenlösungen konnte direkt ohne weitere Behandlung der Gaschromatographie zugeführt werden.

b. Isolierung der Carotinoide aus dem Gesamtlipidextrakt der Thylakoidmembran

Die nach der Verseifung mit 0,5 N methanolischer NaOH-Lsg. anfallenden Petroletherphasen mit den Carotinoiden und Kohlenwasserstoffen (Punkt **2.7.4.a**) wurden vereinigt und im Scheidetrichter mehrmals mit ca. 50- 60 ml H₂O zwecks Neutralisierung der alkalischen Petroletherphase ausgeschüttelt. Anschließend wurde die neutralisierte Petroletherphase im Vakuum-Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Anschließend in wenig Ethanol gelöst und in einen zuvor ausgewogenen 10 ml Spitzkolben überführt. Dann wurde die Carotinoidlösung im Vakuum-Rotationsverdampfer wieder bis zur Trockene eingengt und im Exsikator über Blaugel und angelegtem Vakuum endgültig getrocknet. Zur Bestimmung des Trockengewichtes der vorhandenen Carotinoide wurde der 10 ml Spitzkolben ausgewogen. Anschließend wurden die Carotinoide in Ethanol bis zu einer Endkonzentration von 2mg Carotinoide / ml Ethanol gelöst.

Die quantitative Bestimmung der Carotinoide erfolgte durch die HPLC.

2.7.5. Isolierung der Carotinoide aus Blattmaterial

Hierzu wurden 30- 50 cm² Blatt (Kontroll & CO₂-Pflanzen von JWB & Su/su) ausgeschnitten und in Methanol bei 60° C solange inkubiert, bis die Blattstücke vollständig farblos waren. Anschließend wurden von eventuell vorhandenen Schwebstoffen in der Methanollsg. abzentrifugiert (2000 x g, 5min., Heraeus Minifuge). Danach wurde die Methanollsg. im Vakuum-Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt, zweimal in Ethanol aufgenommen, wieder zur Trockene eingengt, mit 50 ml einer 0,5 N methanolischen NaOH-Lsg. versetzt und für 2 Stunden unter Rückflußkühlung verseift. Nach Zugabe von 30 ml H₂O wurden die Carotinoide mehrmals mit 50 ml destilliertem Petrolether (Petroleumbenzin 50-70° C) aus der Mutterlauge im Scheidetrichter vollständig ausgeschüttelt. Die Petroletherphasen wurden vereinigt und durch Ausschütteln mit H₂O neutralisiert. Die so neutralisierte Petroletherphase mit den Carotinoiden und Kohlenwasserstoffen wurde im Vakuum-Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt, zweimal in Ethanol aufgenommen, wieder bis zur Trockene eingengt und in einer definierten Menge Ethanol aufgenommen.

Die Carotinoideanalyse erfolgte mit HPLC.

2.7.6. Gaschromatographische Analyse der Fettsäuren

Die Analyse der Fettsäuren aus Punkt **2.7.4.a** wurde gaschromatographisch mit dem Hewlett Packard Gaschromatograph 5890 Series II durchgeführt. Bei der Gaschromatographie werden verdampfbare Substanzen zwischen einer flüssigen, stationären und einer gasförmigen, mobilen Phase verteilt. Durch die unterschiedliche Verweildauer in der Säule werden die Substanzen, nämlich die Fettsäuren, nach der Kettenlänge und der Anzahl ihrer ungesättigten Doppelbindungen getrennt. Kurzkettige Fettsäuren verlassen die Säule früher als langkettige Fettsäuren, wobei die gesättigten Fettsäuren eher von der Säule eluieren als die einfach- oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren gleicher Kettenlänge. Als stationäre Phase diente Ethylenglycolsuccinat (10 %) auf Chromosorb. Die mobile Phase N₂ hatten einen Druck von 60 ml/min. Die Säule wurde auf 190° C erhitzt, während der Injektionsblock sowie der Detektor (Flammenionisation) auf 300° C erhitzt wurden. Das aufgezeichnete Gaschromatogramm wurde ausgewertet, indem die Flächen (Areale) unter den einzelnen Peaks addiert und die prozentualen Anteile der verschiedenen Fettsäuren berechnet wurden. Bestimmt wurden die verschiedenen Fettsäuren durch ihre RT (Retention Time) Werte. Es handelt sich dabei um eine graphische Darstellung der Kettenlänge gegen den natürlichen Logarithmus ihrer Retention Time (RT). Desweiteren wurde eine Eichgerade der RT Werte von Standardfettsäuren der Kettenlänge 12- 22 erstellt.

2.7.7. HPLC-Analyse der isolierten Carotinoide

Gerätetyp siehe Punkt **2.7.3** auf Seite 35.

Die benutzten Laufbedingungen waren:

80 % Methanol / 20 % H₂O (Laufmittel A) wechselte in 20 min. nach 60 % Methanol / 40 % Aceton (Laufmittel B). Die Fließgeschwindigkeit betrug 1,5 ml / min.. Zur Detektierung der Carotinoide wurde die Wellenlänge des Spektralphotometers auf 430 nm eingestellt. Der Lauf wurde nach 35 min beendet.

Zur qualitativen & quantitativen Bestimmung der Carotinoide wurde gereinigte (von Herrn Dr. Radunz bereitgestellt) und käufliche Carotinoide (trans-β Carotin der Firma: Sigma) eingesetzt.

2.8. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der verschiedenen Proben (Thylakoide, PS I-Komplexe) in ihre einzelnen Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in modifizierter Form nach Laemmli [1970] in einem *Bio-Rad Mini Protean II Gelkammersystem* (0,75 mm Gelschicht).

2.8.1. Herstellung des SDS-Polyacrylamid-Gel

2.8.1.a Herstellen des Trenngeles

Lösungen:

Gelpuffer: Tris-SDS

24 ml	1N HCL
18,2 g	Tris
230 µl	Temet
0,4 g	SDS (0,4 %)

mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt und mit HCL auf pH: 9,4 eingestellt.

Acryl-Bisacrylamidlösung :

100 ml	40%ige Acrylamidlg (W/V), Merck
1,07 g	N,N'-Methylenbisacrylamid 2x, Serva

Ammoniumperoxosulfatlg.:

0,1 g	NH ₄ perSO ₄
-------	------------------------------------

mit H₂O auf 12,5 ml auffüllt; stets frisch angesetzt.

Tabelle zur Herstellung eines 12%igen SDS-Polyacrylamid-Trenngeles:

Gelpuffer	2,5 ml
Acryl-Bisacrylamidlg. 41.07 % Stammlsg.	2,95 ml
Ammoniumperoxosulfatlg. 0,8 % (W/V)	2,5 ml
H ₂ O	2,05 ml
Gesamtvolumen	10 ml

Pro Gel wurden 3,4 ml der Trenngellsg. eingesetzt.

2.8.1.b. Herstellung des Sammelgeles

Tabelle zur Herstellung des Sammelgeles:

Acryl-Bisacrylamidlg. 41,07 % Stammlsg.	1 ml
1 M Tris-Cl, pH:6,80	0,76 ml
SDS-Lsg. 10 % (W/V)	0,06 ml
Sucroselsg. 60 % (W/V)	2 ml
H ₂ O	2,16 ml
Temet	0,004 ml
Ammoniumperoxosulfatlg. 10 % (W/V)*	0,038 ml
Gesamtvolumen	6,022 ml

*: war stets frisch anzusetzen

Die angesetzte Menge an Sammelgel reicht für 2- 3 Gele (Bio-Rad, Mini Protean II, 0,75 mm)

2.8.1.c. Arbeitsweise

Die Gelkammern (Bio-Rad, Mini Protean II) wurden nach der Bedienungsanleitung zusammengebaut. Nachdem das Trenngel gemäß der Tabelle „Herstellung des Trenngeles“ unter Punkt 2.8.1a zusammen gemischt war, wurde es sofort in die zusammengebauten Gelkammern (zwei Kammern pro System) pipetiert (3,4 ml pro Gel) und mit wassergesättigtem Isobutanol abgedeckt. Nach ca. 1½ Stunde konnte das Isobutanol abgossen werden und mit H₂O ersetzt werden. Danach wurde das Gel mit etwas H₂O auf der Geloberfläche über Nacht stehen gelassen, damit es vollständig auspolymerisiert.

Dann wurde das dest. Wasser von der Geloberfläche abgossen. Das gemäß der Tabelle Herstellung des Sammelgeles unter Punkt 2.8.1.b hergestellte Sammelgel wurde über das

Trenngel gegossen. Danach wurde sofort der zugehörige Kamm in das Sammelgel eingefügt. Nach etwa 1 bis 2 Stunden konnte der Kamm entfernt werden. Die so entstandenen Taschen im Sammelgel wurden mehrmals mit einer dünnen Spritze ausgespült. Gemäß der Bedienungs-anleitung wurden die *Bio-Rad Gelkammer: Mini Protean II* für die Elektrophorese vorbereitet und mit Elektrodenpuffer gefüllt.

Elektrodenpuffer:

6 g	Tris
28,8 g	Glycin
2 g	SDS

mit H₂O auf 2 l aufgefüllt, der pH liegt dann automatisch bei 8,6.

2.8.2. Proben & Probenvorbereitung

Proben:

Pflanzenmaterial	Präparat
JWB & Su/su	Thylakoidmembranen
Kontroll- & CO ₂ -Pflanze	PS I-Komplexe

Probenvorbereitung: [Wynn & Malkin, 1988]

Probenpuffer:

20 mM	Tris-Cl, pH: 8,4
200 mM	Dithiothreitol (DTT)
2,5 % (W/V)	SDS

In jede Tasche konnten maximal 40 µl Volumen (Probe + Probenpuffer) pipetiert werden. Nachdem die Proben mit Probenpuffer versetzt waren, wurden sie bei 50° C für 1 Stunde inkubiert.

2.8.3. Elektrophoresebedingung

Nachdem die Geltaschen mit den einzelnen Proben gefüllt waren, wobei die beiden äußeren Taschen jeweils Probenpuffer + 5 µl einer 0,05 % Bromphenolblausg. enthielten, wurde eine Stromstärke von 35 m Ampere angelegt. Die Elektrophorese fand bei Raumtemperatur statt. Wenn die Bromphenolblaufront den unteren Rand des Geles erreichte, war die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese beendet. Die Gele wurden aus der Gel-Kammervorrichtung entfernt und entweder gefärbt (Silverstain) oder dem Westernblot (Immunoblot) Verfahren zugeführt.

2.9 Silberfärbung der SDS-Polyacrylamidgele (Silverstain)

Die Silberfärbung der SDS-Polyacrylamidgele erfolgte nach einer Methode von O .Kruse et al. [1997].

Lösungen:

Fixierlösung:	40 % Methanol, 3,5 % Formalin (37 % Stammlösung)
Reduzierungslösung:	Dithionit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 0,02 % = 20 mg / 100 ml
Färbelösung:	AgNO_3 , 0,1 % = 100 mg / 100 ml
Entwicklungslösung:	Natriumcarbonat Na_2CO_3 , 3 % = 3 g / 100 ml Formalin 0.05 % = 50 µl / 100 ml Dithionit 0,0004 % = 2 ml der Reduzierungslsg. / 100 ml
Stopplösung:	Iso-2-Propanol, 25 % Essigsäure, 10 %

Lösung zum Trocknen der gefärbten Gele: 30 % Methanol, 5 % Glycerol

Die Färbung der SDS-Polyacrylamidgele erfolgte nach der folgenden Arbeitsweise:

Nach der Beendigung der SDS-Gel-Elektrophorese wurden die SDS-Gele aus der Vorrichtung vorsichtig befreit, das Sammelgel entfernt und wie folgt gefärbt.

1. 10 min. Inkubation in Fixierlösung.
2. 2 x in H_2O Bidest waschen.
3. 1 min. Inkubation in Reduzierlösung.
4. 2 x in H_2O Bidest waschen (a 20 Sekunden).
5. 10 min. Inkubation in der Färbelösung.
6. 1 x in H_2O Bidest waschen.

7. Um Silberreste im Gefäß zu entfernen, wurde das Gefäß mit etwas Entwicklungslösung ausgespült.
8. Zugabe an Entwicklungslösung (das Gel muß vollständig bedeckt sein), unter ständigem Schütteln solange entwickeln, bis alle Proteinbanden gut zu erkennen sind
9. Stoppen der Reaktion durch Inkubation der Gele in der Stopplösung.
10. Zur Trocknung der Gele wurden diese über Nacht in 30 % Methanol, 5 % Glycerol inkubiert.

2.10. Westernblot [Immunoblot, Renart et al., 1979]

Der immunologische Nachweiß einzelner Proteine in den Thylakoidmembranpräparationen aus Kontroll- & CO₂-Pflanzen von JWB & Su/su erfolgte mit Hilfe des Westernblotverfahren [Renart et al., 1979]. Durch den Einsatz von monospezifischen Antisera, die gegen Polypeptide des Photosyntheseapparates gerichtet sind, ist es möglich, zu untersuchen, in wie weit das Wachstum der beiden Tabakpflanzen JWB und Su/su unter einer erhöhten CO₂-Atmosphäre (700 ppm) die Verteilung dieser Proteine in den Thylakoidmembranen verändert hat. Dafür darf aber die Konzentration der Thylakoidmembranen, bezogen auf Chlorophyll, in diesem Testverfahren nicht zu hoch angesetzt werden, da sonst die Bindungskapazität der Nitrocellulose für einige Proteine, die in großen Mengen in der Thylakoidmembranen vorhanden sind, gesättigt ist. Ein möglicher Unterschied in der Markierung der Proteine durch das jeweilige Antiserum wird nämlich bei zu großer Probenkonzentration nicht mehr erkannt. Die Konzentration der Thylakoidmembranen lag bei 0,35- & bei 0,5 µg Chlorophyll.

Lösungen:

Transferpuffer	:	10 mM	Tris	pH: 8,8
		2 mM	EDTA	
		50 mM	NaCl	
		0,1 mM	Dithiothreitol (DTT); immer frisch	
			zusetzen	
CMF-PBS	:	8 g	NaCl	
		200 mg	KCl	
		1,15 g	Na ₂ HPO ₄	
		200 mg	KH ₂ PO ₄	

mit H₂O auf 1 l auffüllen

Absättigungslsg.	:	5 %	Milchweiß (W/V), gelöst in CMF-PBS
Waschlsg.	:	0,5 %	Milchweiß (W/V)
		0,05 %	Tween 20 (Sigma), gelöst in CMF-PBS
Lösung für 1. Antikörper	:	0,5 %	Ovalbumin, gelöst in CMF-PBS
Lösung für 2. Antikörper	:	0,5 %	Ovalbumin, gelöst in CMF-PBS
Tris-Cl-Puffer	:	50 mM	Tris-Cl pH: 7,35
Entwickler	:	60 mg	4-Chloro-1-Naphtol wird in 20 ml Methanol gelöst und anschließend wird 100 ml Tris-Cl-Puffer pH: 7,35 hinzugegeben.

Kurz vor der Entwicklung der Blots wird dem **Entwickler** 20 µl H₂O₂ zugegeben.

Die Durchführung erfolgte nach folgender Arbeitsweise:

Nach der Auftrennung der Thylakoidmembranpräparation (Probenkonzentration: 0,35 & 0,5 µg Chlorophyll) aus JWB und Su/su Kontroll & CO₂-Pflanzen im SDS-Polyacrylamidgel (Punkt **2.8.**) wurde das Gel 3 x 10 min. in **Transferpuffer** gewaschen, während Filterpapier und die Nitrocellulose (Schleicher & Schuell BA 85) in der Größe des Gels in Transferpuffer getränkt wurde. Auf eine saubere und fettfreie Glasplatte wurden drei Lagen Filterpapier, eine Lage Nitrocellulose, das Polyacrylamidgel und wiederum eine Lage Nitrocellulose, drei Lagen Filterpapier und zur Abdeckung eine weitere saubere und fettfreie Glasplatte luftbalsenfrei gelegt. Damit während des Blotting der ganze Stapel nicht austrocknet, denn eine solcher **Druckblot** benötigt bei Raumtemperatur 24 Stunden für einen vollständigen Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrocellulose, wurde dieser vorsichtig in einen Plastikbeutel gepackt und verschlossen. Auf diesen Stapel wurde nun ein Gewicht von 2 kg gelegt (Druckblot).

Nach dem Transfer (24 Stunden) wurde die Nitrocellulose 3 x 10 min. in **CMF-PBS** gewaschen (Schüttler) und anschließend zur Abdeckung der noch vorhandenen freien Bindungsstellen für 2 Stunden in **Absättigungslsg.** inkubiert. In diesem Stadium können die Nitrocellulosestreifen problemlos mit der Absättigungslsg. eingefroren werden. Nach der Absättigung der Nitrocellulose wurden diese 2 x 10 min. in der **Waschlsg.** gewaschen. Es folgte nun die Inkubation der Nitrocellulose mit den jeweiligen Antikörper (Kaninchen-IgG) für mindestens 2 bis maximal 4 Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurde die Nitrocellulose 2 x 10 min. in **Waschlsg.** gewaschen. Es folgte dann die zweite Antikörperinkubation der Nitrocellulose (Anti-Kaninchen-IgG aus Schwein, konjugiert mit Peroxidase, der Firma: DAKO Diagnostika) bei Raumtemperatur für eine Stunde bei

absoluter Dunkelheit, da die an Anti-Kaninchen-IgG gebundene Peroxidase lichtempfindlich ist. Die Verdünnung betrug 1: 100. Alle weiteren Schritte wurde bei Dunkelheit ausgeführt. Danach wurden die Nitrocellulosestreifen 3 x 10 min. mit **Waschlsg.**, 1 x 10 min. in **CMF-PBS** und zuletzt 2 x 10 min in **Tris-CL-Puffer** gewaschen. Dann folgte zuletzt die Inkubation der Nitrocellulosestreifen unter Abzug im **Entwickler**. Die Inkubation dauerte so lange bis die Markierung der entsprechenden Proteine gut sichtbar war (blauviolette Färbung durch die Peroxidasereaktion mit 4-Chloro-1-Naphtol und H₂O₂ als Substrat). Zuletzt wurden die Nitrocellulose mehrmals mit H₂O gewaschen, photographiert und *eingescannt*.

2.11. Antiseren

Die in dieser Arbeit eingesetzten Antiseren wurden am Lehrstuhl für Zellphysiologie der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld hergestellt. Die Antiseren sind durch Immunisierung von Kaninchen gewonnen worden.

Folgende Antiseren wurden im Westernblot-Verfahren eingesetzt.

Antiserum	Antigen	Hersteller/in [Literatur]
68 D ₄	PsaA/B (CP1)	Makewicz A. [1995a]
58 A ₂	D1	Gärtner [Specht et al., 1990]
25 A ₄	MSP	Kuhlmann [Specht et al., 1990]
32 F ₇	Cytochrom F	Schmid G.H. [Radunz A., 1978]
24 A ₁	CP 47	Specht [Specht et al., 1990]
69 R ₂	CF1 (alpha-Untereinheit)	Meyer [Radunz et al., 1989]
27 D ₁₃	LHC (28 kDa Untereinheit)	Endler A. [Dädelow et al., 1995]

Folgende Verdünnungen wurden eingesetzt.

Antiserum	Verdünnung in 0,5% Ovalbumin in CMf-PBS
68 D ₄	1 : 150
58 A ₂	1 : 2000
25 A ₄	1 : 2500
32 F ₇	1 : 1000
24 A ₁	1 : 2000
69 R ₂	1 : 2000
27 D ₁₃	1 : 20000

2.12. Messung der photosynthetischen Aktivität

2.12.1. Warburg-Manometrie

Für die Messung der photosynthetischen Aktivität von **Blättern**, bzw. von **Blattstücken** eignet sich im besonderen Maße die Warburg-Manometrie. Diese von Otto Warburg Anfang der 20er Jahre entwickelte manometrische Methode basiert auf den Gasgesetzen. Die messende Verfolgung von Gasumsätzen unter genau definierten Versuchsbedingungen ist die eigentliche Aufgabe der manometrischen Technik. Der Aufbau der Warburg-Manometrie-Anlage, sowie das Prinzip der Messung der Gasumsätze erfolgte entsprechend der Literatur [Kleinzeller, 1965; Kayser, kein Publikationsdatum].

Die photosynthetische Aktivität von Blattstücken kann einmal über die Entwicklung von O₂ im Gasraum gemessen werden, andererseits kann aber auch die Assimilation von CO₂ durch das Blattmaterial, also die Abnahme von CO₂ im Gasraum als photosynthetische Aktivität bestimmt werden. In beiden Fällen muß jedoch eines der beiden Gase konstant gehalten werden, um eine korrekte Aktivitätsbestimmung durchführen zu können.

Im Fall der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität der Blattstücke als O₂-Entwicklung bei konstanter CO₂-Konzentration gemessen.

Als CO₂-Puffer diente ein Na-Bicarbonat-Puffersystem, hergestellt aus 0,1 M Na₂CO₃ & 0,1 M NaHCO₃.

Die Konzentration an CO₂ im Gasraum lag bei 0,45 % CO₂. Um diese Konzentration an CO₂ im Gasraum zu erreichen, muß der pH-Wert des Na-Bicarbonat-Puffersystem bei 9,2 liegen.

In die Reaktionsgefäße wurden je 3ml des Na-Bicarbonat-Puffers pipetiert. Die Blattstücke lagen mit Hilfe eines Drahtgestelles im Gasraum über diesem CO₂-Puffer. Die eingesetzte Größe der Blattstücke lag bei dem Wildtyp JWB bei 2 cm² und bei der Tabakmutante Su/su bei 3 cm².

Die Lichtintensität zur Messung der photosynthetischen Aktivität wurde über einen Dimmer geregelt. Die minimale Beleuchtungsstärke lag bei 46 µE / m² x sec (µEinstein) und die maximale Intensität bei 282 µE / m² x sec.

2.12.2. Clark-Sauerstoff-Elektrode.

Die photosynthetische Aktivität isolierter **Chloroplasten, PS II-Membranen und PS I-Komplexen** wurde mittels einer Clark-Sauerstoff-Elektrode der Firma Rank Brothers gemessen. Als Schreiber diente das Fabrikat Servogor 310. Die Polarisationsspannung lag stets bei 640 mVolt. Die Belichtung der Versuchsansätze in der Clark-Elektrode wurde mit einer Halogenlampe der Firma Stindler & Hoyer, Göttingen durchgeführt. Um höhere

Beleuchtungsstärken zu erreichen wurden noch zusätzlich 1 bis 2 Diaprojektoren der Firma Leitz (Prado Universal) hinzugezogen. Bei allen drei Lampen wurden Plexiglas-Rotfilter (Roehm, Darmstadt) eingesetzt. Zusätzlich wurde der Lichtstrahl der Halogenlampe durch eine mit 4%iger CuSO₄ Lsg. (W/V) gefüllten Glasküvette geleitet, um die Wärmestrahlung herauszufiltern. Zur Herabsetzung der Lichtintensität, wurden Transmissionsfilter eingesetzt. Sofern die photosynthetische Aktivität nicht in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen wurde, lag diese bei 20° C (*Thermostat*, Firma B. Braun Melsungen).

Das Versuchsvolumen pro Ansatz lag bei 3 ml.

Um die Sauerstoff-Entwicklung oder -Aufnahme berechnen zu können, ist es notwendig die Elektrode mit Na-Dithionit (Na₂S₂O₄) zu eichen. Bei einer Temperatur von 20° C sind in 1 ml luftgesättigtem Wasser 0,284 µM O₂ gelöst.

Die Reaktionsraten wurden nach folgender Formel berechnet:

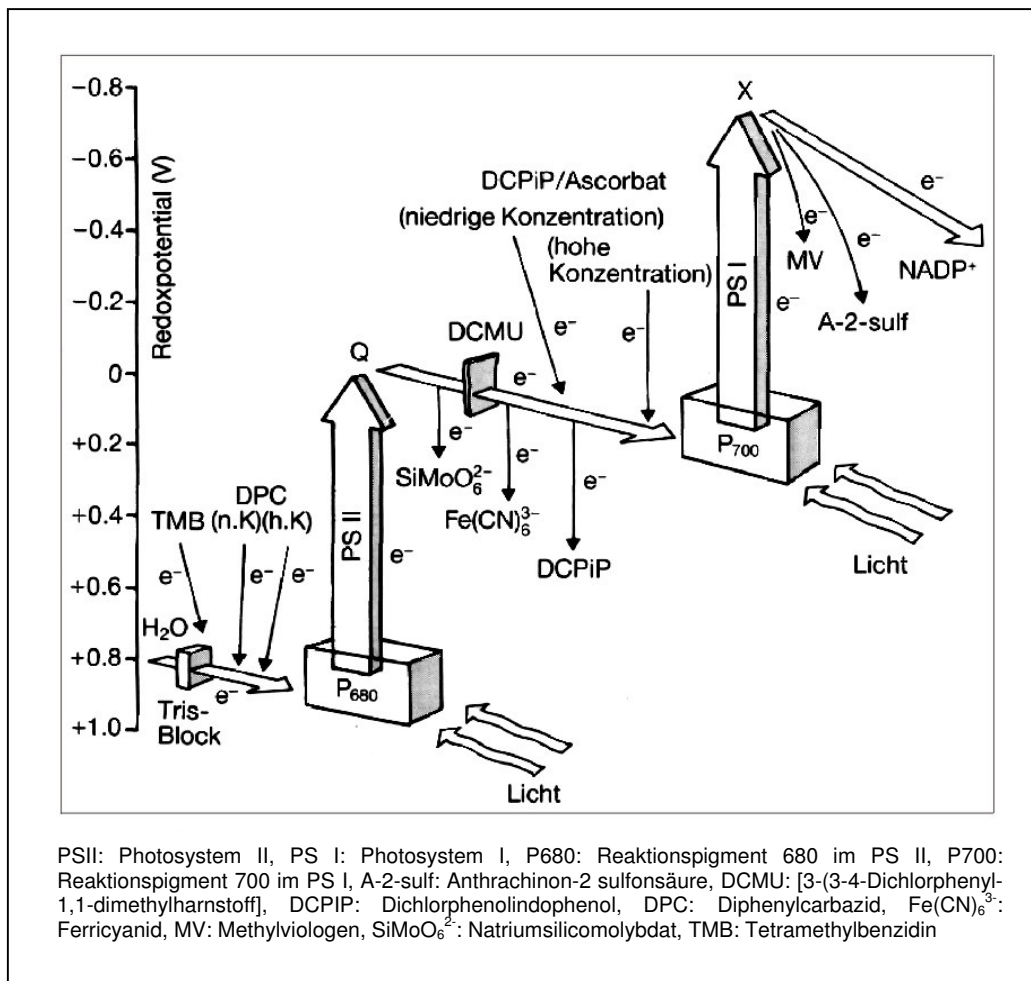
$$\frac{284 \times 10^{-3} (\mu\text{M O}_2/\text{ml}) \times 3 (\text{ml Reaktionsvolumen}) \times (\text{Skt.}_{\text{Reaktion}} / \text{min}) \times 60 (\text{min.})}{\text{Skt.}_{\text{Eichung}} \times \text{Chlorophyll (mg)}}$$

mit Skt. = Skalenteile

Die berechneten Werte werden in µM O₂ / mg Chlorophyll (Chl.) × Stunde (h) angegeben.

Mit Hilfe von geeigneten chemischen Verbindungen, die als Elektronendonatoren und als Elektronenakzeptoren Elektronen an spezifischen Stellen der photosynthetischen Elektronentransportkette gemäß ihres Redoxpotentials einschleusen und/oder abgreifen können, ist es möglich, den Gesamtprozeß der Lichtreaktion der Photosynthese in Teilreaktionen aufzutrennen und zu analysieren.

Abb.: Z-Schema des photosynthetischen Elektronentransports mit der Angabe der ungefähren Einschleusstellen für die in der Abb. angegebenen Elektronendonatoren und den ungefähren Abgreifstellen für die genannten Elektronenakzeptoren [Schmid, 1993].



Zur Messung des photosynthetischen Elektronentransports von H_2O über Photosystem II (PS II) in isolierten Chloroplasten und PS II-Membranen wurde dem Versuchsansatz Kaliumhexacyanoferrat III (FeCy) hinzugegeben. FeCy greift die Elektronen hinter Photosystem II ab, wie die obige Abbildung anschaulich darlegt. Damit ist die lichtbetriebene Sauerstoff-Entwicklung in isolierten Chloroplasten und PS II-Membranen von der Aktivität des PS II abhängig.

Eine Blockade des Elektronentransports im PS II durch die Zugabe des Herbizids 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU) bringt den Elektronenfluß im PS II zum Erliegen. Dies ist sinnvoll, wenn man nur die Aktivität des Photosystems I (PS I) in isolierten Chloroplasten messen möchte. Dazu wird dann aber ein Elektronendonator benötigt, da der Elektronenfluß von H_2O über PS II durch DCMU blockiert ist. Hierfür wurde in der vorliegenden Arbeit Dichlorphenolindophenol (DCPIP) verwendet. Wird DCPIP durch Ascorbat reduziert, ist es bei hohen Konzentrationen in der Lage Elektronen direkt an das PS I abzugeben. Als Elektronenakzeptor wurde Methylviologen (MV) gewählt. MV greift die

Elektronen direkt hinter dem PS I ab. Dabei wird Sauerstoff verbraucht (Mehlerreaktion). Die Reaktion verläuft dabei folgendermaßen: $MVH_2 + O_2 \rightarrow MV + H_2O_2$. Das Wasserstoffperoxid-Molekül (H_2O_2) wird durch das Enzym Katalase, welches in Chloroplasten vorkommt, in $H_2O + \frac{1}{2} O_2$ gespalten. Durch Zugabe von Kaliumcyanid (KCN) wird die Katalase gehemmt. Das durch die Mehlerreaktion entstandene H_2O_2 wird daher nicht gespalten, es kommt zu einer Verringerung des Sauerstoffgehaltes im Reaktionsansatz. Die Clark-Sauerstoff-Elektrode mißt also einen lichtbetriebenen Sauerstoff-Verbrauch (auch als O_2 -Aufnahme bezeichnet), der von der Aktivität des PS I abhängig ist.

Will man in isolierten Chloroplasten den photosynthetischen Elektronentransport von H_2O über die beiden Photosysteme (I und II) in der Clark-Sauerstoff-Elektrode messen, so gibt man dem Versuchsansatz nur MV und Kaliumcyanid (KCN) hinzu. Auch in diesem Fall wird natürlich ein Sauerstoff-Verbrauch gemessen.

Der Chlorophyllgehalt der zu messenden Proben lag zwischen 5- und 30 μg pro Ansatz.

Folgende Versuchsansätze wurden durchgeführt.

Messung der Ferricyanid Hill Reaktion (PS II-Aktivitätsmessung).

Messung des Elektronentransports von H_2O über Photosystem II nach Kaliumhexocyanoferrat (III).



<u>Reaktionsansatz</u>	:	
Reaktionspuffer	:	Hepes 1, pH: 6,5
Elektronenakzeptor	:	$K_3Fe(CN)_6^{-3}$ (Kaliumhexacyanoferrat III) 10 mM, 0,1 ml/Ansatz
Präparat	:	Chloroplasten, PS II-Membranen

Messung des Elektronentransports von H_2O über die 2 Photosysteme nach Methylviologen (Mehlerreaktion).



<u>Reaktionsansatz</u>	:	
Reaktionspuffer	:	Hepes 1, pH: 6,5
Elektronenakzeptor	:	Methylviologen 3 mM, 0,1 ml / Ansatz
Katalasehemmer	:	KCN (Kaliumcyanid) 30 mM, 0,1 ml / Ansatz

Präparat : Chloroplasten

Messung des Elektronentransports von Dichlorphenolindophenol über Photosystem I nach Methylviologen (PS I-Aktivitätsmessung).

Dichlorphenolindophenol (DCPIP)/Ascorbat → Methylviologen (MV)

Reaktionsansatz :

Reaktionspuffer: : Hepes 1, pH: 7,5
Elektronendonator : DCPIP (Dichlorphenolindophenol) 5 mM, 0,1 ml / Ansatz
Reduktionsmittel : Na-Ascorbat 10 mM, 0,1 ml / Ansatz
Elektronenakzeptor : Methylviologen 3 mM, 0,1 ml / Ansatz
Katalasehemmer : KCN 30 mM, 0,1 ml / Ansatz
PS II-Inhibitor : DCMU 5 mM, 0,1 ml / Ansatz
Präparat : Chloroplasten, PS I-Komplexe

Zur Messung der verschiedenen photosynthetischen Aktivitäten (Hill-, Mehlerreaktion & PS I-Aktivität) unter Entkopplung der ATP-Synthase-Aktivität des CF₀-CF₁-Komplexes in den Thylakoidmembranen (bei Chloroplastenpräparationen) wurde den jeweiligen Ansätzen zusätzlich (NH₄)₂SO₄ (Stammkonzentration: 9 mM, 0,1 ml / Ansatz) zugegeben. Wurde die Lichtintensität nicht variiert, so lag diese bei 1511 μE / m² x sec. (Halogenlampe).

2.12.2.a Einfluß der Lichtintensität auf die Hill- und Mehlerreaktion, sowie auf die PS I-Aktivität.

Bei dieser Untersuchungsreihe wurde die Lichtintensität mittels Transmissionsfiltern und zusätzlichen Projektoren variiert. Die Ansätze entsprechen den unter Punkt 2.5.2 aufgeführten Reaktionansätzen (Hill-, Mehlerreaktion & PS I-Aktivität)

Für diese Meßreihe wurden Chloroplasten-, PS II-Membran- & PS I-Präparationen eingesetzt. Die Chlorophyllkonzentration lag zwischen 5 - 30 μg Chlorophyll / Ansatz. Die Temperatur lag bei 20° C.

2.12.2.b Abhängigkeit der PS I-Aktivität von der Konzentration des Elektronendonors Dichlorphenolindophenol (DCPIP) im Reaktionsansatz.

Bei dieser Meßreihe wurde die Konzentration an DCPIP im Reaktionsansatz variiert. Die Lichtintensität betrug $1511 \mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec.}$ und $4930 \mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec.}$. Chloroplasten und PS I-Komplexe dienten als Versuchsobjekte. Die Temperatur lag bei 20°C .

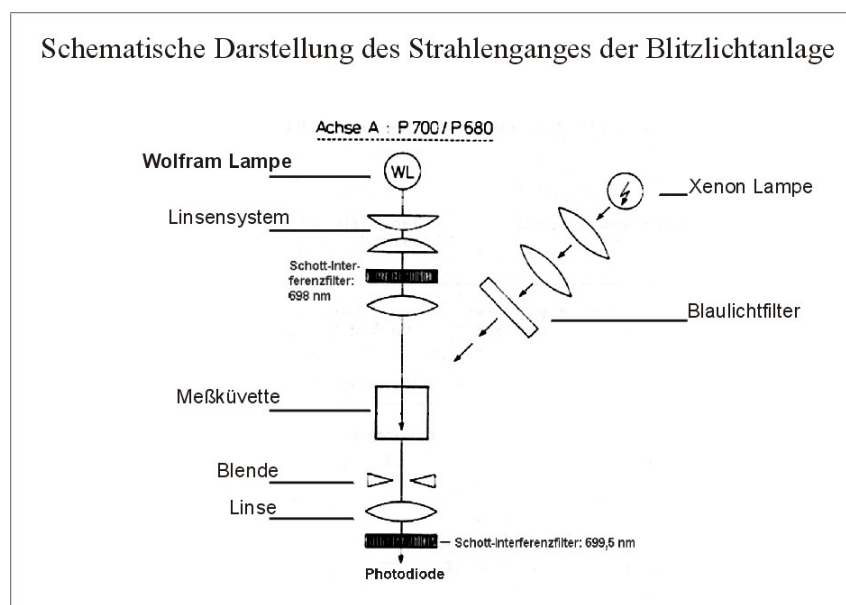
2.12.2.c Einfluß der Temperatur auf die Hill- und Mehlerreaktion, sowie auf die PS I-Aktivität.

Bei dieser Meßreihe wurde die Temperatur variiert. Die Lichtintensität betrug $1511 \mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec.}$. Die Ansätze entsprechen denen unter Punkt 2.12.2. Als Versuchsobjekte dienten Chloroplasten. Die Mehlerreaktion wurde unter Zugabe des Entkopplers $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gemessen.

2.13. Blitzlichtspektroskopie (Messung der P700 Absorption)

Blitzlicht induzierte Absorptionsänderungen, wie sie beim photosynthetischen Elektronentransport einzelner Komponenten der Elektronentransportkette auftreten, wurden mit einer nach Rüppel und Witt [1969] und Witt [1971] konstruierten Versuchsanlage am Lehrstuhl für Zellphysiologie gemessen. Folgende Skizze zeigt den schematischen Aufbau des Strahlenganges der Blitzlichtanlage¹.

Wird eine chlorophyllhaltige Probe (Chloroplasten, PS I-Komplexe) mit schwachem Licht



¹ Skizze (bearbeitet) aus „Untersuchungen zum Einfluß der Stickstoffquelle im Kulturmedium auf den photosynthetischen Elektronentransport bei *Oscillatoria chalybea*“ Diplomarbeit von Susanne Höper, 1991

einer bestimmten Wellenlänge (698 nm) bestrahlt, so kann man ein Absorptionssignal (I_0) messen, welches immer durch Rauschen überlagert wird. Durch zusätzlich Bestrahlung der chlorophyllhaltigen Probe mit sehr kurzen Lichtblitzen kann eine Änderung des Absorptionssignal (dI) induziert werden. Die aus einer solchen Belichtungsmethode erhaltenen Absorptionsänderungen (dI / I_0) sind sehr gering und weisen nur sehr kurze Halbwertszeiten (bis zu 10^{-15} sec.) auf. Da sich das Rauschen mit verbesserter zeitlicher Auflösung verstärkt, wird zur Messung der Signale die repetitive Blitzlichtanregung verwendet. Dies verbessert das Signal / Rausch-Verhältnis proportional zur Quadratwurzel der Anzahl der Messungen [Rüppel und Witt, 1969].

Mit dieser Methode wurde die Aktivität bzw die Konzentration der Reaktionszentren von Photosystem I gemessen. Dies wurde durch Messung der blitzlichtinduzierten Absorptionsänderung bei 700 nm (P700-Signal) erreicht. Interferenzfilter der Firma Schott wurden zur Einstellung der Wellenlänge eingesetzt (699,5 & 698 nm). Zur Einstellung des Dauerlichtes wurde ein Schott-Interferenzfilter mit einer Wellenlänge von 698 nm verwendet. Die Halbwertsbreite dieses Interferenzfilters liegt bei 20 nm. Vor der Photodiode wurde ein Schott-Interferenzfilter mit einer Transmissionswellenlänge von 699,5 nm, welches eine Halbwertsbreite von 11 nm aufwies, montiert. Zur Anregung der chlorophyllhaltigen Proben mit Lichtblitzen diente eine Xenon-Lampe (EG & G Multiflash Model 553, 20J), deren Blitzfrequenz durch ein Pulsgenerator gesteuert wurde (5 Hz). Die Signale wurden mit einer Silicium-Photodiode (EG & G, SGD 444 F) aufgenommen und verstärkt (20000fach) und über einen Mittelwertrechner (Tracor, Northern) summiert und normiert. Aufgezeichnet wurden die Signale mit einem Hewlett-Packard 7045 B X-Y Recorder.

Gemessen wurde die blitzlichtinduzierten P700-Signale von Chloroplasten und PS I-Komplexen. Das Volumen der Meßküvette betrug 4 ml. Die Chlorophyllkonzentration lag bei allen Proben bei 10 μ g Chlorophyll / ml. Als Puffer wurden **Hepes 1** und **Chloroplastenaufschlußpuffer** eingesetzt. Aufgrund des gleichen Chlorophyllgehaltes in den Proben ist ein direkter Vergleich der blitzlichtinduzierten P700-Absorptionssignale zwischen den Kontroll- & CO₂-Präparationen möglich.

Zudem wurde das P700-Signal beim Elektronentransport über die gesamte Elektronenkette von PS II nach PS I (P700) mit H₂O als Elektronendonator und NADP⁺ als natürlichen Elektronenakzeptor gemessen. Die maximale Absorptionsänderung im P700 des Photosystems I wurde unter Einsatz des Elektronendonators Dichlorphenolindophenol (DCPIP in Gegenwart von Na-Ascorbat) und Methylviologen als Elektronenakzeptor gemessen.

Folgende Elektronendonor- und Elektronenakzeptoren-Konzentrationen wurden pro Versuchsansatz eingesetzt.

Dichlorphenolindophenol (DCPIP) :	10^{-4} Mol
Na-Ascorbat (Reduktionsmittel) :	5×10^{-3} Mol
Methylviologen :	10^{-8} Mol
DCMU (PS II Inhibitor) :	5×10^{-4} Mol

2.14. Bestimmung des Chlorophyll / P700-Verhältnisses isolierter PS I-Komplexe

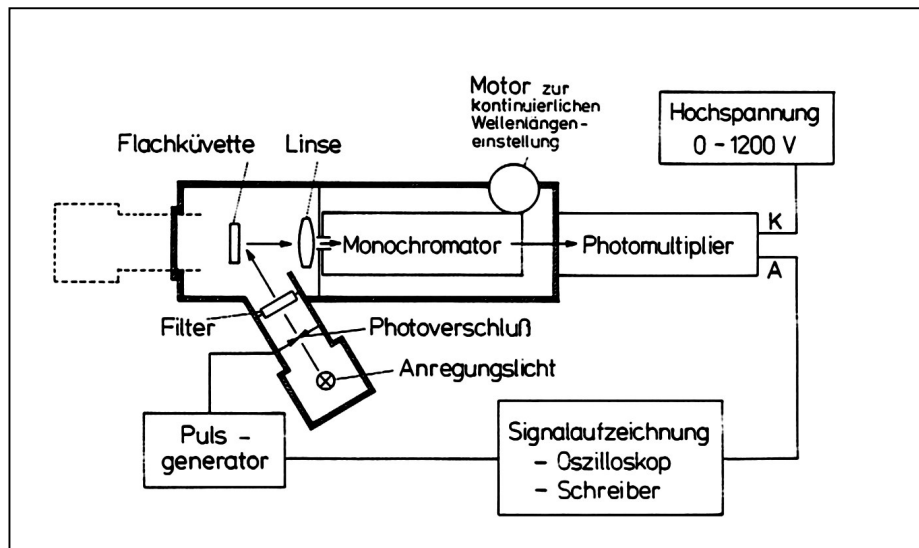
Bei dieser Methode wurde das Verhältnis von Chlorophyll zu P700, dem Chlorophyll a des Reaktionszentrum von PS I, über die Messung eines Differenzspektrums unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen bei Raumtemperatur bestimmt.

In zwei Küvetten wurden identische PS I-Präparationen mit gleichen Chlorophyllkonzentrationen gefüllt (1 ml Volumen). Als Puffer diente **Chloroplastenaufschlußpuffer**. Anschließend wurde in die erste Küvette 5 µl einer 100 mM Na-Ascorbatlsg. zugegeben. In die zweiten Küvette wurde 5µl einer 5 mM Kaliumhexacyanoferrat III Lsg. einpipetiert. Die erste Küvette wurde in den Blindwertschacht und die zweite Küvette in den Meßschacht eines Perkin-Elmer, Lambda 3 UV/VIS Spectrophotometer gestellt. Das Differenzspektrum wurde über den Bereich von 550- 800 nm aufgezeichnet (Schreiber: Perkin-Elmer 561 Recorder). Anschließend wurden in die beiden Küvetten je 5 µl einer 100 mM Na-Ascorbatlsg. hinzugegeben und ein zweites Differenzspektrum aufgezeichnet.

Die Konzentration an P700 in den Küvetten wurde durch die reversible Änderung der Absorption bei 700 nm über das Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet. Der Extinktionskoeffizient beträgt nach T.Hiyama & Bacon Ke [1972] $64 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Aufgrund des bekannten Chlorophyllgehaltes in den Küvetten (15 µg Chlorophyll) kann das Verhältnis von Chlorophyll zu P700 bestimmt werden.

2.15. Fluoreszenz

Die folgende Skizze zeigt den schematischen Aufbau der Fluoreszenz-Meßanlage, die im Lehrstuhl für Zellphysiologie entwickelt wurde.



Zur Anregung der Fluoreszenz wird eine Xenophot HLX-Glühlampe (Osram) verwendet. Um die Chlorophyll a-Fluoreszenz anzuregen, wird das Anregungslicht durch ein Schott-Filter BG 28, das nur Licht des blauen Spektralbereiches zwischen 380- 500 nm durchläßt, geleitet. Die Fluoreszenzintensität wird durch den Photomultiplier (EMI Electronics Ltd. Typ 9658) in elektrische Signale umgewandelt, welche von einem Oszilloskop (Fabrikat Tektronix, Storage Oscilloscope) aufgenommen werden.

Gemessen wurde die Fluoreszenzinduktion von dunkeladaptierten Blättern und Chloroplasten bei 685 nm. Die Dunkelinkubation betrug bei den Blättern 30 min. und bei den Chloroplasten 3 min.. Bei Chloroplasten wurde die Chlorophyll a-Konzentration pro Messung auf 50 µg eingestellt. Als Puffer diente **Chloroplastenaufschlußpuffer**. Das Volumen der Flachküvette betrug 2 ml. Die Blätter wurden zwischen zwei Glasplatten in die Halterung gesteckt.

Bei den Chloroplastenpräparationen wurde die Fluoreszenzinduktion der Ansätze einmal ohne exogene Zusätze und mit Zusatz von DCMU aufgezeichnet. Bei den Blättern wurde zur Messung der maximalen Fluoreszenz eine zwei- bis dreistündige Inkubation in 5 mM DCMU durchgeführt.

2.16. Bestimmung der ATP Konzentration in isolierten Chloroplasten

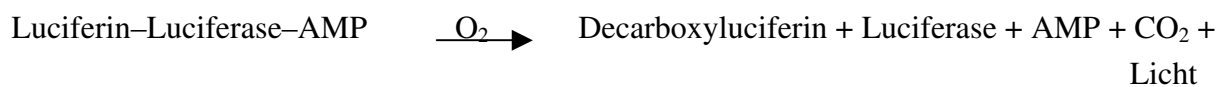
Bestimmt wurde die ATP-Konzentration in frisch isolierten Chloroplasten der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm). Dazu wurden die frisch isolierten Chloroplasten durch eine sofortige Zugabe von 0,05 ml einer 50%igen Trichloressigsäure abgetötet. Die Konzentration der Chloroplasten wurde wie immer auf Chlorophyll bezogen. Diese lag für die isolierten

Chloroplasten der Tabakpflanze JWB bei 200 µg Chlorophyll pro Ansatz (50 mM Tris-Cl, pH: 7,25) und die der chlorophyllarmen Mutante Su/su bei 100 µg Chlorophyll pro Ansatz.

Nach der Zentrifugation der abgestorbenen Proben bei 3000 x g für 10 min wurden 2 µl des Überstandes in 5 ml 20 mM Hepes, pH. 7,75 verdünnt, auf 25° Celsius temperiert und die Lumineszenz in dem Biocounter M 2010 der Firma Lumac gemessen.

Die Konzentration an ATP wird dabei indirekt über die frei werdenden Photonen bestimmt, die bei der folgenden Reaktion der ATP-haltigen Probe mit dem Enzym Luciferase entstehen.

Folgende Reaktionsgleichung gibt das Prinzip wieder:



Ein frei werdendes Photon entspricht dabei einem Molekül ATP.

Mittels einer hergestellten Eichgerade aus einer bekannten Menge an ATP kann über die Anzahl der Photonen auf die Konzentration an ATP in der Probe geschlossen werden.

2.17 Berechnung der Standardabweichung vom Mittelwert.

Berechnet wurde die Standardabweichung ausgehend von der Gesamtheit der Messergebnisse. Für die Standardabweichung wird die Methode *Asymtotisch erwartungstreue Schätzung* oder *n* verwendet (diese Methode zur Berechnung der Standardabweichung wird bei dem Programm *Excel 97* angewandt).

Formel:
$$\sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n^2}}$$

3. Ergebnisse

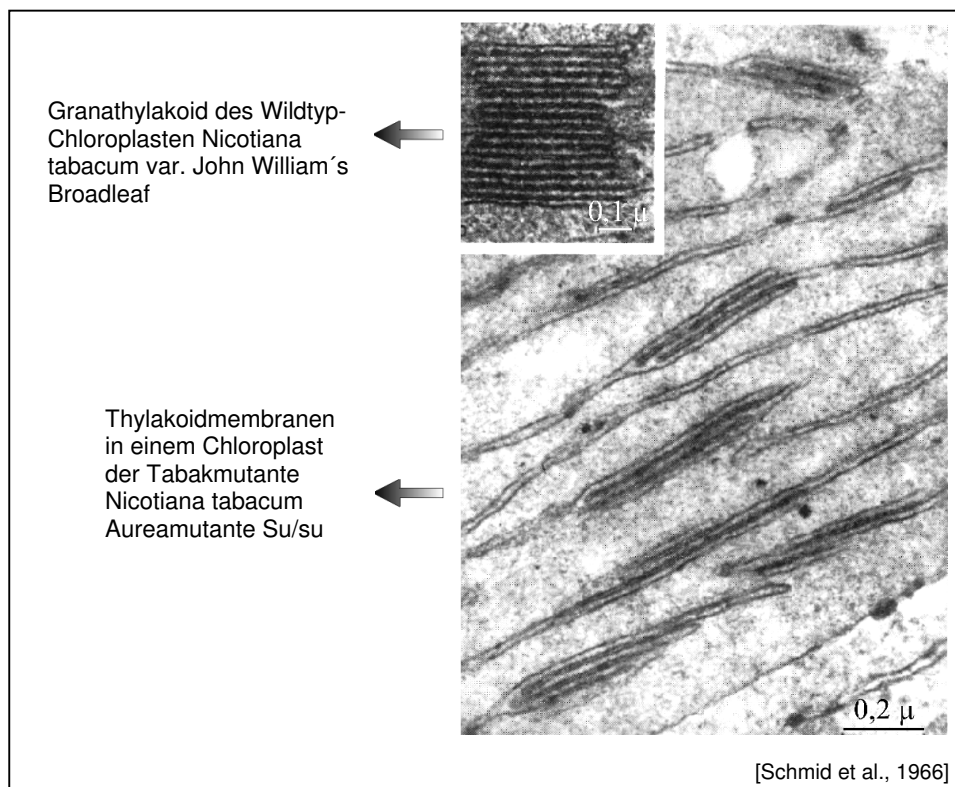
3.0 Pflanzenmaterial

In der vorliegenden Arbeit sind die Anpassungserscheinungen des Photosyntheseapparates auf eine erhöhte CO_2 -Konzentration von 700 ppm der beiden Tabakpflanzen *Nicotiana tabacum* var. *JWB* und seiner chlorophyllarmen Mutante *Su/su* untersucht worden. Die Ultrastruktur der Chloroplasten der chlorophyllarmen Mutante *Su/su* unterscheidet sich erheblich von der des Wildtyps *JWB* [Schmid, 1971].

Die Blätter des Wildtyps (*JWB*) weisen eine dunkelgrüne Blattfärbung auf. Das Lamellensystem in den Chloroplasten ist charakteristisch für Höhere Pflanzen in Grana- und Stromathylakoide differenziert.

Die chlorophyllarme Tabakmutante *Su/su* hat grüngelbe Blätter, deren Chloroplasten im Vergleich zum Wildtyp *JWB* ein wesentlich einfacher gebautes Lamellensystem besitzen. Die Thylakoidmembranen sind weniger gestapelt (siehe Abb. 3.1). Dieser Struktur entspricht eine Reduzierung des Lichtsammel-Antennen-Komplexes (LHC) in den Thylakoidmembranen der Aurea-Mutante [Schmid und Gaffron, 1967].

Abb. 3.1 Elektronenmikroskopische Aufnahme des Lamellarsystems in Chloroplasten der Tabakpflanzen *Nicotiana tabacum* var. John William's Broadleaf und der chlorophyllarmen Mutante *N. tabacum* Aureamutante *Su/su*.



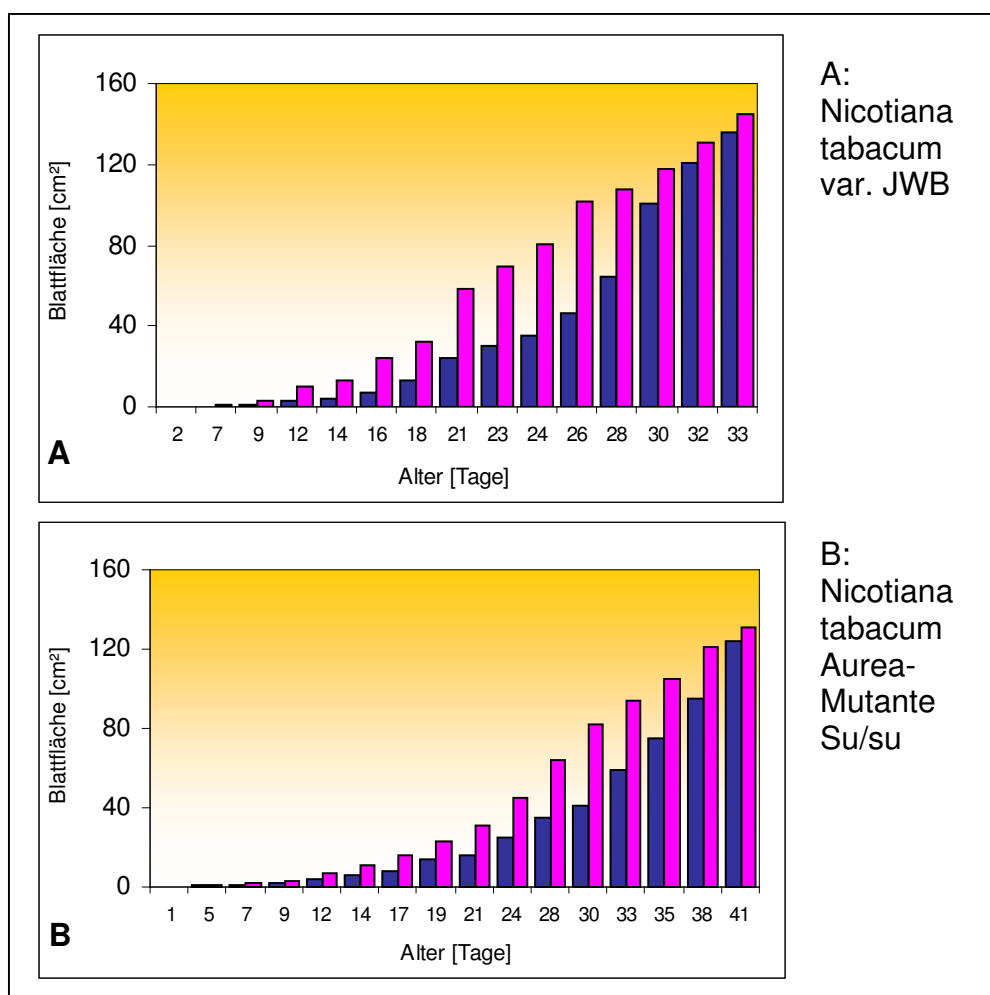
3.0a Verwendete Nomenklatur

Bisher gibt es in der Literatur, die sich mit der Anpassung Höherer Pflanzen auf eine erhöhte CO_2 -Atmosphäre befasst, keine spezielle oder einheitliche Bezeichnung. In dieser vorliegenden Arbeit wurde zur Unterscheidung der Pflanzen und der verschiedenen Präparationen aus diesen jeweils das Wort „Kontroll“ oder die Bezeichnung „ CO_2 “ vor den jeweiligen Begriff gesetzt. Die Wörter, die mit CO_2 beginnen, sind kursiv geschrieben (z.B. *CO_2 -Pflanze*, *CO_2 -Chloroplasten*, *CO_2 PS II-Membranen* usw.).

3.1 Blattflächenwachstum

In der vorliegenden Arbeit wurde das Flächenwachstum definierter Blätter über die Zeit aufgenommen. Hierfür wurde der Umriß der Blätter auf Millimeterpapier übertragen, ausgeschnitten und in der Analysenwaage gewogen. Mittels einer Eichgeraden konnte dann die Fläche bestimmt werden. Zur Bestimmung des Blattflächenwachstums wurden jeweils das zweite Blatt nach den beiden Keimblättern herangezogen. Pro Meßwert wurden 6 Blätter ausgemessen.

Abb. 3.2 Zunahme der Blattfläche in Abhängigkeit vom Alter der Tabakpflanzen N.t.var JWB (A) und Su/su (B), angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO_2 -Konzentration (700 ppm).



Das Wachstum der beiden Tabakpflanzen *Nicotiana tabacum* var. *John William's Broadleaf* und der chlorophyllarmen Mutante Su/su unter dem erhöhtem CO₂-Partialdruck von 700 ppm führt zu einem deutlich verstärktem Wachstum der Blätter gegenüber den Kontrollanzuchten, die unter dem natürlichen CO₂-Gehalt von 350 ppm aufwachsen.

Die Abnahme des Blattflächenwachstums des 2. Blattes nach den beiden Keimblättern bei den beiden CO₂-Pflanzen gegenüber den Kontrollanzuchten ist experimentell begründet. Aufgrund der Größe der Glaskammern wird die Expansion der Blätter, wenn sie eine Größe von über 100 cm² erreicht haben, gestört. Dies führt zu einer Restriktion des Blattflächenwachstum der entsprechenden Blättern in den CO₂-Glaskammern. Da die Kontrollanzuchten nicht in begrenzten Glaskammern aufwachsen, können sich die Blätter ungestörter ausbreiten.

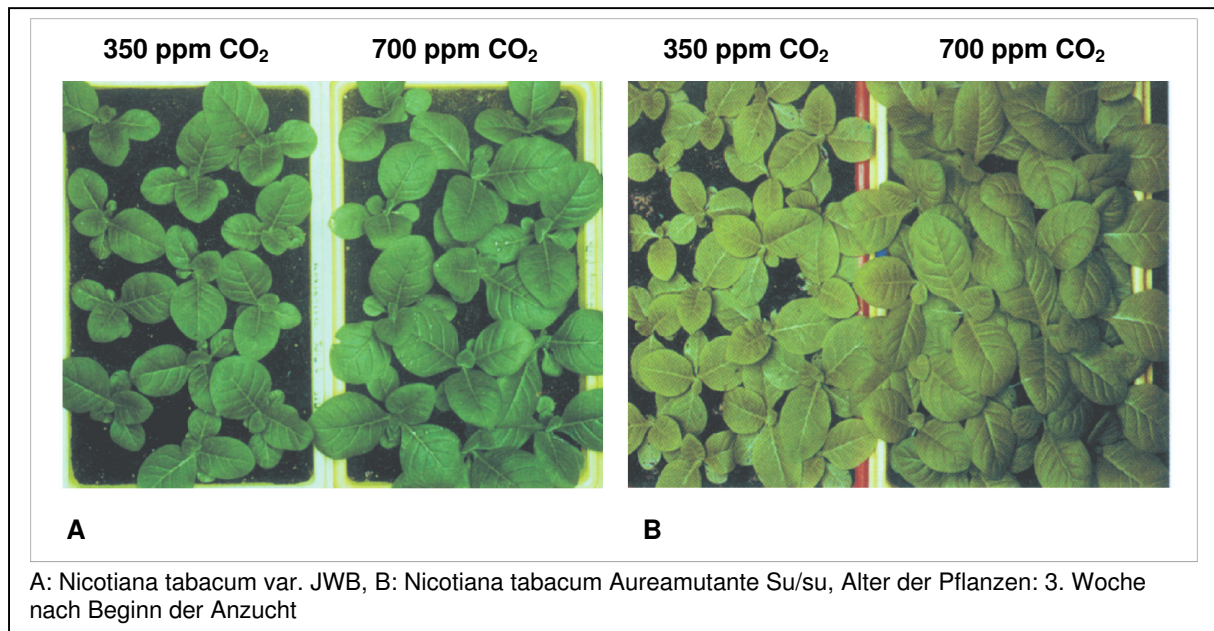
Aufgrund dieses Ergebnisses werden nur die Anpassungserscheinungen des Photosyntheseapparates Höherer Pflanzen auf eine erhöhte CO₂-Konzentration von 700 ppm dargestellt und diskutiert, die nicht auf eine experimentell bedingte Veränderung im „Source/Sink“ Gleichgewicht [Heldt, 1996] der Pflanzen beruhen. Bei dem Wildtyp JWB ist das die Zeit bis zu 30 Tagen und bei der Mutante Su/su die Zeit bis zu 40 Tagen nach Beginn des Experimentes.

Denn auch wenn die jüngeren Blätter der CO₂-Pflanzen sich noch ungestört ausbreiten können, so kann nicht ausgeschlossen werden, dass ab dem 30. Wachstumstag bei dem Wildtyp JWB und ab dem 40. Wachstumstag bei der Mutante Su/su aufgrund der Abnahme des Blattflächenwachstums der älteren, somit größeren Blätter es zu einer Veränderung des „Source/Sink“ (Quell / Verbrauch) Gleichgewichtes in den CO₂-Pflanzen kommt, was sich auch auf den Photosyntheseapparat der beiden Tabakpflanzen auswirken kann. Innerhalb des Meßzeitraumes von 30 und 40 Tagen können „Root/Shoot Imbalancen“ (Wurzel/Sproß Ungleichgewichtigkeit) bei den JWB und Su/su CO₂-Pflanzen ausgeschlossen werden.

Die in Abb.3.2. dargestellten Wachstumskurven wurden im Frühjahr aufgenommen. Das Wachstumsverhalten ist bei den beiden Tabakpflanzen trotz Aufzucht in Klimakammern mit konstanten Umgebungsparametern über das Jahr verteilt nicht konstant. Im Frühjahr und Sommer zeigen die Tabakpflanzen ein stärkeres Wachstum, als im Herbst und Winter. Das heißt, dass die Kurvenverläufe des Blattflächenwachstums der beiden Tabakpflanzen und ihrer CO₂-Pflanzen im Winter flacher ausfallen.

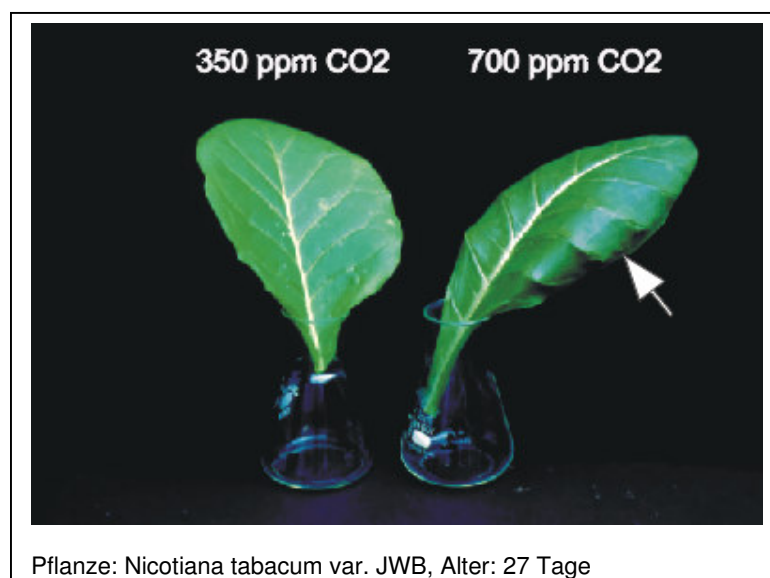
3.3 Die Auswirkung des erhöhten CO₂-Angebot auf den Habitus der Blätter

Abb. 3.3 *Nicotiana tabacum* var. John William's Broadleaf (A) und *Nicotiana tabacum* Aureamutante Su/su (B), angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm).



Die Anzucht der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su unter einer erhöhten CO₂-Konzentration von 700 ppm führt, wie die Abb. 3.3 zeigt, zu einem deutlich erhöhtem Wachstums im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollpflanzen, welche unter dem natürlichen CO₂-Druck von 350 ppm CO₂ aufgewachsen sind.

Abb. 3.4 Vergleich der Blattanatomie von *Nicotiana tabacum* var. John William's Broadleaf, angezogen unter natürlicher (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm).



Ab Ende der dritten Woche nach Beginn des Experimentes verändert sich das Aussehen der *CO₂-Pflanzen* im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. Die Abb. 3.4 zeigt eine Fotografie einzelner Blätter des Wildtyps JWB, angezogen unter ambienter (350 ppm) und erhöhter *CO₂*-Konzentration (700 ppm). Die Blätter der *CO₂-Pflanzen* zeigen ein verstärktes Längenwachstum, während das Wachstum der Blätter in die Breite mit dem Längenwachstum nicht mitkommt. Dies gilt auch für die Tabakmutante Su/su. Die Blattränder der *CO₂-Pflanzen* beginnen sich verstärkt einzurollen (siehe Abb. 3.4 Pfeil). Es sieht so aus, wie wenn das Wachstum der Blattränder nicht mit dem Wachstum der Blätter in der Blattmitte mitzukommt. Charakteristisch für die Blätter der *CO₂-Pflanzen* sind außerdem die besonders stark ausgeprägten Leitungsbahnen. Das Verhältnis Blattfläche zu Leitungsbahnen ist bei den *CO₂-Blättern* deutlich in Richtung Leitungsbahn verschoben. Dieser Effekt tritt ebenfalls ab Ende der dritten Wachstumswoche auf.

Auffällig ist auch das Verhalten der *CO₂-Pflanzen* wenn sie aus den *CO₂*-Kammern für kurze Zeit dem normalen *CO₂*-Druck von 350 ppm ausgesetzt werden. Hierbei beobachtet man, dass die Blätter der *CO₂-Pflanzen* unter dem natürlichen *CO₂*-Druck welken. Werden sie wieder in die *CO₂*-Kammer zurückgebracht, so bekommen die Blätter nach kurzer Zeit wieder ihre alte Festigkeit zurück.

Demnach ist bei den Tabakpflanzen JWB & Su/su eine Veränderung des stomatären Verhaltens der beiden *CO₂-Pflanzen* eingetreten. Die experimentelle Erhöhung der *CO₂*-Konzentration führt zu einem Anstieg des *CO₂*-Gehaltes im Blattinneren der *CO₂-Pflanzen* [Bowes, 1996; Sage, 1994]. Die Erhöhung des internen *CO₂*-Gehaltes kann bei *CO₂ sensitiven Stomatas* zu einer deutlichen Reduzierung der stomatären Leitfähigkeit führen. Die geringere stomatäre Leitfähigkeit, verursacht durch die Erniedrigung der stomatären Dichte der Blätter oder durch das veränderte stomatäre Verhalten der *CO₂-Pflanzen*, ist ein typischer *CO₂-Effekt* von *C₃*-Pflanzen, die unter einem erhöhtem *CO₂*-Gehalt in der Versuchsatmosphäre aufwachsen [E.Reining, 1994]. Dennoch, nicht alle höheren Pflanzen des *C₃*-Typs besitzen *CO₂ sensitive Stomatas* [E.Reining, 1994].

Unter normaler *CO₂*-Konzentration versuchen die *CO₂-Pflanzen* nun die interne *CO₂*-Konzentration aufrecht zu erhalten. Dies führt dann zu einer verstärkten Öffnung der Spaltöffnungen. Da die interne *CO₂*-Konzentration der *CO₂-Blätter* der beiden Tabakpflanzen unter dem natürlichem *CO₂*-Gehalt nicht erreicht werden kann, verbleiben die Stomatas in geöffnetem Zustand, so dass die *CO₂-Blätter* vermehrt Wasser durch erhöhte Transpiration verlieren. Dieser verstärkte Verlust an Wasser pro Zeiteinheit erniedrigt den Turgor in den Zellen der *CO₂-Blätter*. Als Folge beginnen die *CO₂-Blätter* unter der natürlichen *CO₂*-Konzentration zu welken.

3.3 Chlorophyll-, Carotinoid- und Proteinbestimmung

Zur allgemeinen Charakterisierung der Blätter, Chloroplasten, Thylakoidmembranen, Photosystem II-Membranen und Photosystem I-Komplexe der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su und ihrer *CO₂-Pflanzen* wurden die Chlorophyll-, Carotinoid- und Proteinmengen bestimmt. Die Chlorophyllbestimmung erfolgte nach der Methode von G.H. Schmid [1971]. Die Carotinoidmenge wurde durch die allgemeine Carotinoidabsorption bei 430 nm abzüglich der Chlorophyllkonzentration bestimmt [nach G.H. Schmid]. Der Wert gibt die allgemeine Carotinoidmenge wieder und macht keine Aussage über die Zusammensetzung der Carotinoide in den einzelnen Präparationen. Die Proteinkonzentration wurde mittels des Bicinchoninsäure-Tests [Smith et al., 1985] und mit Neßler's Reagenz [Williams, 1968] bestimmt.

a) **Blatt**

Tabelle 3.1 Chlorophyll-, Carotinoid- und Proteinbestimmungen von Blättern der Tabakpflanzen N.t.var. JWB und Su/su, angezogen unter ambienter (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm).

	JWB Blatt		Su/su Blatt	
	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂
Gesamtchlorophyll [µg/cm ²]	34,91 ± 5,5	35,18 ± 7	7,14 ± 1,7	7,16 ± 1,8
Chlorophyll a/b	3,13 ± 0,2	3,06 ± 0,2	4,74 ± 1,4	3,97 ± 1,4
Carotinoid [µg/cm ²]	7,6 ± 2,4	8,26 ± 3,1	2,27 ± 0,4	2,28 ± 0,5
Chlorophyll/Carotinoid	4,34 ± 0,3	4,27 ± 0,3	3,1 ± 0,5	3 ± 0,4
Protein [µg / cm ²]	615,1 ± 92,9	571,3 ± 128,5	507 ± 93,9	472,3 ± 111,1
Trockengewicht/Protein	2,77 ± 0,6	2,69 ± 0,6	2,73 ± 0,3	2,61 ± 0,4
Protein / Chlorophyll	18,1 ± 2,6	15,6 ± 3,5	68,8 ± 10,7	56,6 ± 10,8
Trockengewicht/Chlorophyll	49 ± 10,6	39 ± 9,7	219 ± 46,7	158 ± 48,4

Tabelle 3.1 gibt die Chlorophyll-, Carotinoid- und Proteinwerte der Blätter der beiden Tabakpflanzen JWB und Su/su wieder. Zusätzlich sind die Verhältniswerte Chlorophyll a zu b (w/w), Chlorophyll zu Carotinoid (w/w), Trocken- zu Proteingewicht (w/w), Protein zu Chlorophyll (w/w) und Trockengewicht zu Chlorophyll (w/w) der Blätter angegeben. Die angegebenen Werte, auch die der Verhältnisangaben, sind Mittelwerte. Die klein gedruckten

Zahlenwerte geben die Standardabweichungen wieder. Das Alter der Pflanzen variierte bei der Wildform JWB von 9 bis 30 Tagen und bei der chlorophyllarmen Mutante von 14 bis 40 Tagen. Im Mittel lag das Alter bei JWB um 22 Tage und bei der Mutante Su/su um 27 Tage. Innerhalb dieser Zeiträume bleiben Protein-, Chlorophyll- und Carotinoidwerte pro cm² Blatt bei beiden Tabakpflanzen recht konstant. Jahreszeitliche Schwankungen wirken stärker auf den Protein-, Carotinoid- und Chlorophyllgehalt der Blätter ein. In der Winterzeit weisen die Blätter im Mittel einen höheren Gehalt an Protein, Chlorophyll und Carotinoid pro Einheit Blatt auf als in den Sommermonaten.

Ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der Anpassung des Photosyntheseapparates der beiden Tabakpflanzen an eine erhöhte CO₂-Konzentration ist der Chlorophyllgehalt in den Blättern. Die Tabelle 3.1 zeigt auf:

Die Verdopplung der CO₂-Konzentration auf 700 ppm hat bei den beiden Tabakpflanzen keinen Einfluß auf den durchschnittlichen Gehalt an Gesamtchlorophyll pro cm² Blatt.

Im Folgendem werden die Ergebnisse in Tabelle 3.1 zunächst für den Wildtyp JWB und anschließend für die Mutante Su/su beschrieben.

Die Anzucht des Wildtyps JWB unter einer erhöhten CO₂-Konzentration hat keine Auswirkung auf das Chlorophyll *a/b* Verhältnis der Blätter. Auch das Chlorophyll/Carotinoid Verhältnis zeigt bei den CO₂-Pflanzen keinen nennenswerten Unterschied zu den Kontrollanzuchten, obwohl im Mittel der Carotinoidgehalt pro cm² Blatt bei den CO₂-Pflanzen gegenüber den Kontroll-Pflanzen leicht erhöht ist.

Das Verhältnis Chlorophyll zu Carotinoid (w/w) bleibt bei Anzucht der Tabakpflanze JWB unter einer erhöhten CO₂-Konzentration konstant. Der Proteingehalt pro cm² Blatt nimmt bei den CO₂-Pflanzen ab. Im Durchschnitt fällt die Proteinkonzentration um 7 % kleiner aus.

Also hat die Anzucht der Tabakpflanze *Nicotiana tabacum* var. *John William's Broadleaf* unter einer erhöhten CO₂-Atmosphäre von 700 ppm keine signifikante Auswirkung auf den Proteingehalt der Blätter.

Die leichte Verringerung des Proteingehaltes pro cm² Blatt bei den CO₂-Pflanzen ist gekoppelt mit dem Trockengewicht der Blätter.

Das Wachstum des Tabak-Wildtyps JWB unter einer zweifach erhöhten CO₂-Atmosphäre hat keinen Einfluß auf den Quotient Trockengewicht zu Protein (w/w) der Blätter. Die Abnahme an Protein pro cm² Blatt bei den CO₂-Pflanzen führt auch zu einer Erniedrigung des Verhältnis Protein/Chlorophyll gegenüber den Kontrollansätzen. Auch der Quotient aus Trockengewicht/Chlorophyll nimmt bei den CO₂-Pflanzen im Vergleich zu den Kontroll-Pflanzen deutlich ab.

Bei der Tabakmutante Su/su bleibt der Chlorophyllgehalt in den Blättern der CO₂-Pflanzen gegenüber den Kontrollanzuchten, wie schon weiter oben beschrieben, konstant. Die Blätter der CO₂-Pflanzen weisen aber gegenüber den Kontrollansätzen eine dramatische Erniedrigung des Chlorophyll *a/b* Verhältnisses (w/w) auf.

Die Anzucht der Tabakmutante Su/su unter einer erhöhten CO₂-Atmosphäre führt zu einer starken Abnahme des Chlorophyll *a/b* Verhältnisses (w/w) bei unverändertem Chlorophyllgehalt pro cm² Blatt. In den Chloroplasten der Blättern der CO₂-Pflanzen hat also eine Umverteilung von Chlorophyll *a* nach Chlorophyll *b* stattgefunden. Dies deutet auf eine Zunahme des LHC in den Thylakoidmembranen der CO₂-Pflanzen hin, da Chlorophyll *b* ausschließlich am LHC gebunden ist [H. Y. Yamamoto and R. Bassi, 1996]. Der Carotinoidgehalt pro cm² Blatt wird durch die Verdopplung der CO₂-Konzentration in der Versuchsatmosphäre nicht beeinflusst. Die Blätter der CO₂-Pflanzen weisen im Durchschnitt die gleichen Werte auf wie die der Kontroll-Pflanzen.

Das Wachstum der Tabakmutante Su/su unter einem CO₂-Partialdruck von 700 ppm hat keine Konsequenz auf das Chlorophyll/Carotinoid Verhältnis (w/w) der Blätter.

Die Erhöhung der CO₂-Konzentration in der Versuchsatmosphäre führt zu einer leichten Abnahme der Proteinmenge pro cm² Blatt. Wie schon bei der Wildform weiter oben beschrieben, bleibt das Verhältnis Trockengewicht/Protein (w/w) auch bei der Mutante Su/su zwischen den Kontroll- & CO₂-Pflanzen recht konstant.

Die Anzucht der Tabakmutante Su/su unter einer zweifach erhöhten CO₂-Konzentration hat keinen signifikanten Einfluß auf den Proteingehalt pro cm² Blatt. Das Verhältnis Trockengewicht zu Protein (w/w) hat bei den Blättern der CO₂-Pflanzen von Su/su keine Veränderung erfahren. Die Verhältnisse Protein/Chlorophyll (w/w) und Trockengewicht/ Chlorophyll (w/w) weisen bei den CO₂-Blättern im Mittel gegenüber den Kontrollanzuchten deutlich kleinere Werte auf.

Der Abfall des Proteingehaltes pro cm² Blatt bei den CO₂-Pflanzen gegenüber den Kontrollanzuchten der beiden Tabakpflanzen ist offenbar ein typischer CO₂-Effekt. Bei vielen Untersuchungen über die Anpassungserscheinungen der Höheren Pflanzen auf eine erhöhte CO₂-Konzentration in der Versuchsatmosphäre wurde oft eine Verringerung des Proteingehaltes pro Einheit Blatt gefunden. Eine Erhöhung der Stickstoffzugabe während des Experimentes muß nicht zu einer Erhöhung der Proteinmenge pro Einheit Blatt bei den CO₂-Pflanzen führen. Es scheint eher so zu sein, dass die Stickstoffaufnahme nicht mit der vermehrten Kohlenstoffaufnahme in den CO₂-Pflanzen mithalten kann [Conroy and Hocking, 1993; Mitchel et al., 1993]. Daher verschiebt sich das Verhältnis Kohlenstoff zu Stickstoff bei den CO₂-Pflanzen in Richtung Kohlenstoff [Sage, 1994; Bowes, 1991, 1996].

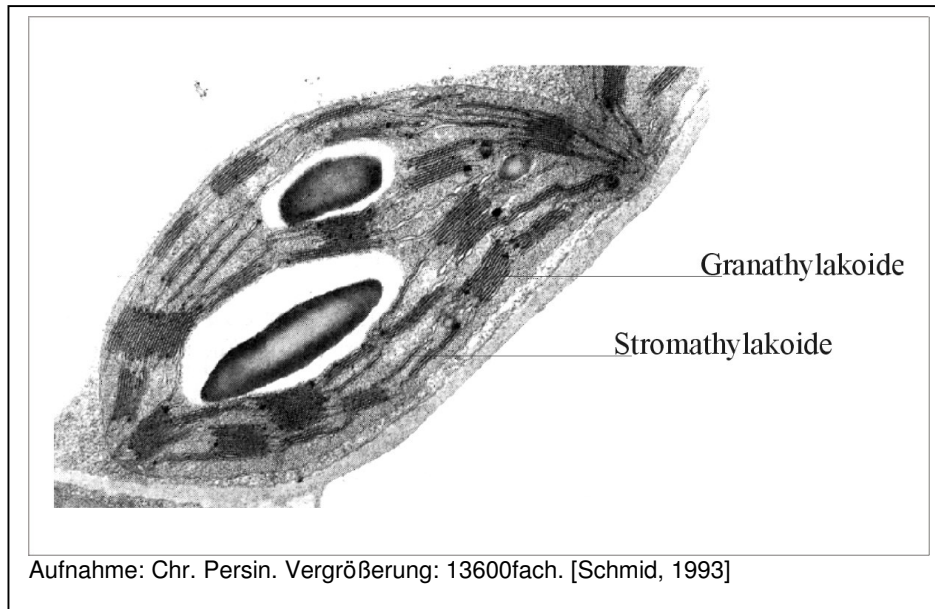
Bestimmt man den Proteingehalt einer einzelnen ganzen Pflanze, so weisen die CO₂-Pflanzen der beiden Tabaksorten im Vergleich zu den entsprechende Kontroll-Pflanzen mehr Protein auf [Radunz, nicht veröffentlicht].

b) Chloroplast

Die Zellorganelle Höherer Pflanzen und Grünalgen, in der die Photosynthese stattfindet, ist der Chloroplast. In Höheren Pflanzen ist dies ein ellipsoider Körper mit einem Volumen von

50 – 100 μ^3 [Schmid, 1993]. Die folgende Abbildung zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Chloroplasten von *Nicotiana tabacum* var. *Consolation*.

Abb. 3.4 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Längsschnittes durch ein Chloroplasten von *Nicotiana tabacum* var. *Consolation*.



Die folgende Tabelle 3.2 gibt die Verhältnisse Chlorophyll a zu b (w/w), Chlorophyll zu Carotinoid (w/w) und Protein zu Chlorophyll (w/w) isolierter Chloroplasten der beiden Tabaksorten JWB und Su/su und ihrer CO_2 -Pflanzen wieder. Das Alter der Pflanzen zur Zeit der Isolierung der Chloroplasten variierte bei dem Wildtyp JWB von 9 bis 30 Tagen und bei der chlorophyllarmen Mutante Su/su von 14 bis 40 Tagen. Das mittlere Alter lag bei JWB um 24 Tage und bei der Tabakmutante Su/su um 30 Tage.

Tabelle 3.2 Chlorophyll a/b-, Chlorophyll/Carotinoid- und Protein/Chlorophyll Verhältnis isolierter Chloroplasten aus den Tabakpflanzen N.t. var. JWB und Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter (700 ppm) CO₂-Konzentration.

	JWB Chloroplasten		Su/su Chloroplasten	
	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂
Chlorophyll a/b	3,1 ± 0,6	3,1 ± 0,5	4,2 ± 1,5	3,4 ± 1,4
Chlorophyll / Carotinoid	4,3 ± 0,2	4,3 ± 0,2	2,9 ± 0,8	3,2 ± 0,8
Protein / Chlorophyll	6,6 ± 1,2	5,3 ± 1,4	35,2 ± 10,4	23,9 ± 7,4

Das Alter der Pflanzen hat bei der Isolierung der Chloroplasten innerhalb der in dieser Arbeit gesetzten Meßzeiträume (30 Tage für JWB & 40 Tage für Su/su) keinen Einfluß auf die Verhältnisse Chlorophyll a zu b (w/w) und Chlorophyll zu Carotinoid (w/w) der isolierten Chloroplasten.

Die Anzucht der Tabakwildform JWB unter einer erhöhten CO₂-Atmosphäre hat keine Auswirkung auf das Chlorophyll a/b- (w/w) , als auch auf das Chlorophyll/Carotinoid Verhältnis (w/w) der isolierten Chloroplasten im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollanzuchten. Das Protein/Chlorophyll Verhältnis der isolierten Chloroplasten aus den CO₂-Pflanzen liegt im Mittel um 20 % unter dem der Kontrollpflanzen.

Das Wachstum der Tabakpflanze JWB unter einer erhöhten CO₂-Atmosphäre führt im Bezug auf Chlorophyll zu einem deutlichem Verlust an Protein im Chloroplasten.

Bei der Mutante Su/su führt das Wachstum der Pflanzen unter dem erhöhtem CO₂-Gehalt zu einer signifikanten Reduzierung des Chlorophyll a/b Verhältnisses (w/w) der isolierten Chloroplasten. Dabei bleibt das Chlorophyll/Carotinoid Verhältnis (w/w) der isolierten Chloroplasten aus den CO₂-Pflanzen gegenüber den Kontrollanzuchten konstant.

Das Verhältnis Protein zu Chlorophyll (w/w) der isolierten Chloroplasten erfährt beim Wachstum der Tabakmutante Su/su unter dem erhöhtem CO₂-Gehalt eine dramatische Veränderung. Im Mittel liegt das Protein/Chlorophyll Verhältnis (w/w) der isolierten CO₂-Chloroplasten um über 30 % unter dem der Kontrollpräparationen. Da der Chlorophyllgehalt in den Blättern der CO₂-Pflanzen gegenüber den Kontrollanzuchten keine Veränderung erfahren hat (siehe Tabelle 3.1), beruht die starke Abnahme des Protein/Chlorophyll Verhältnisses (w/w) der isolierten CO₂-Chloroplasten in Tabelle 3.2 gegenüber den Kontroll-Chloroplasten auf der großen Abnahme an Protein in den Chloroplasten der CO₂-Pflanzen. **Die Anzucht der Tabakmutante Su/su unter einer erhöhten CO₂-Atmosphäre von 700 ppm führt im Bezug auf Chlorophyll zu einem dramatischen Verlust an Protein in den Chloroplasten.**

Die Ergebnisse der Chlorophyll a/b- und der Chlorophyll/Carotinoid Verhältnisse isolierter Chloroplasten beider Tabaksorten und ihrer *CO₂-Pflanzen* spiegeln die Ergebnisse der entsprechenden Verhältnisse für Blätter in der Tabelle 3.1 wieder. Dies entspricht der Tatsache, dass Chloroplasten als Zellorganellen der Photosynthese alle photosynthetisch aktiven Pigmente (Chlorophyll a & b und Carotinoide) enthalten [Richter, 1988]. Demnach entsprechen die Verhältnisse Chlorophyll a zu b (w/w) und Chlorophyll zu Carotinoid (w/w) der Blätter denen der isolierten Chloroplasten. Bemerkenswert ist jedoch, dass bei beiden Tabakpflanzen das Verhältnis Protein zu Chlorophyll (w/w) bei den Chloroplastenpräparationen aus den *CO₂-Pflanzen* gegenüber den Kontrollen im Mittel stärker abfällt als auf dem Niveau ganzer Blattstücke.

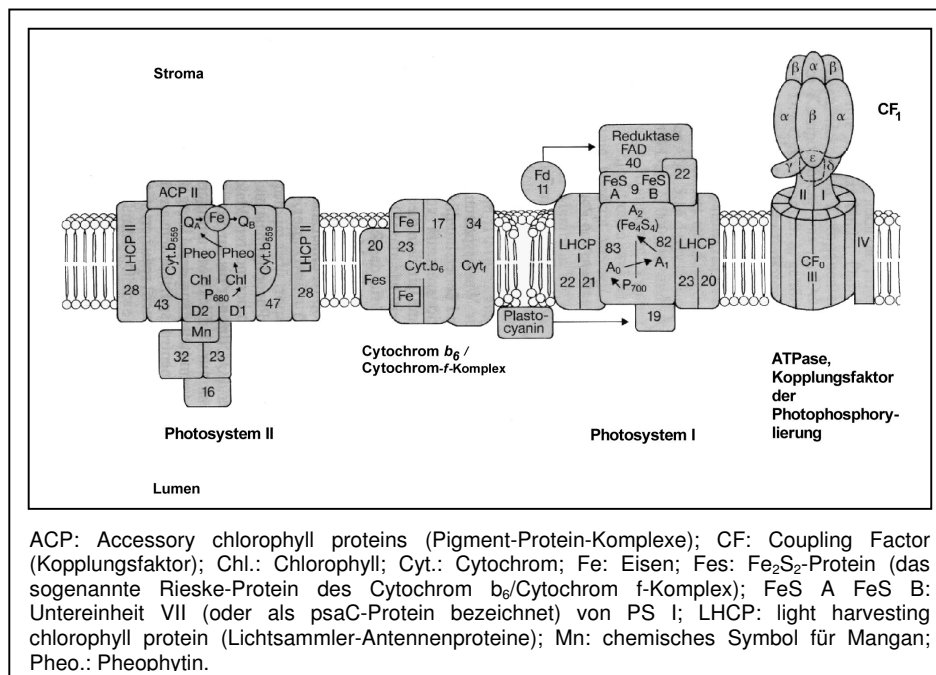
Dies fällt besonders bei der chlorophyllarmen Mutante Su/su auf. Während im Mittel das Protein/Chlorophyll Verhältnis der *CO₂-Blätter* gegenüber den Kontroll-Blättern um 18 % kleiner ausfällt, liegt der Wert des Protein/Chlorophyll Verhältnisses der *CO₂-Chloroplasten* im Schnitt um 30 % unter dem Wert des Protein/Chlorophyll Verhältnis der entsprechenden Kontrollpräparationen.

Die Anzucht der beiden Tabaksorten JWB und Su/su unter 700 ppm CO₂ führt also zu einer erheblich verminderten Zuteilung an Protein für die *CO₂-Chloroplasten* oder zu einem stärkeren Proteinexport aus den *CO₂-Chloroplasten* gegenüber den Kontrollpräparationen. Dies wird besonders bei der Mutante Su/su deutlich.

c) **Thylakoidmembran**

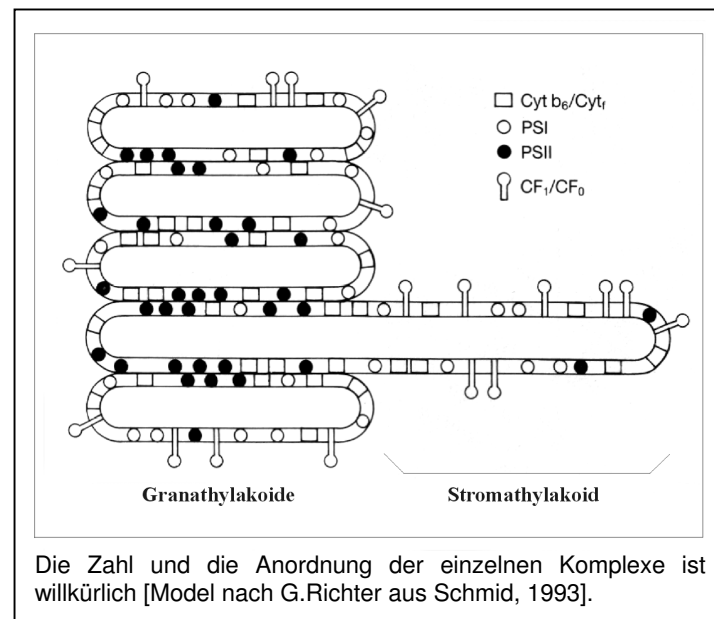
In den Thylakoidmembranen der Chloroplasten sind alle Komponenten des Photosyntheseapparates, welche die Lichtreaktion der Photosynthese bewerkstelligen, lokalisiert. Die folgende Abbildung zeigt die Struktur und Anordnung der verschiedenen Membrankomplexe des Photosyntheseapparates Höherer Pflanzen.

Abb. 3.5 Struktur und Anordnung der Membrankomplexe von Photosystem II, Photosystem I, des Cytochrom- b_6 /Cytochrom f -Komplexes und des Kopplungsfaktors der Photophosphorylierung in der Thylakoidmembran [Schmid, 1993].



Die in der Abbildung 3.5 dargestellten Proteinkomplexe sind wegen der besseren Übersicht vereinfacht dargestellt. Die Photosysteme I und II sind in ihrer Struktur komplexer aufgebaut als hier gezeigt. In dieser Abbildung ist der photosynthetische Elektronentransport nicht dargestellt. Zudem fehlt der Plastochinonpool, der Photosystem II mit dem Cytochrom b_6 /Cytochrom- f -Komplex verbindet. Die beiden Photosysteme I und II sind nicht gleichmäßig in der Thylakoidmembran verteilt. Die Photosystem II-Komplexe findet man hauptsächlich in den Granathylakoiden, während die Photosystem I-Komplexe vermehrt in den Stromathylakoiden lokalisiert sind. Das Lamellarsystem, wenn man es von der Seite als senkrechten Schnitt durch das Granum betrachtet, zeigt also bezüglich Struktur und Funktion eine transversale Heterogenität, die sich auch beim Lipidaufbau wiederfindet [Schmid, 1993]. Die folgende Abbildung zeigt ein Model, welches die transversale Heterogenität der Thylakoidmembranen in einem Chloroplasten vom Typ Höherer Pflanzen darstellt.

Abb. 3.6 Model zur supramolekularen Organisation der Membranen von Grana- und Stromathylakoiden in Chloroplasten Höherer Pflanzen.



Die folgende Tabelle 3.3 gibt das Ergebnis der Chlorophyll- und der Carotinoid- sowie der Proteinbestimmung isolierter Thylakoidmembranen der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su und ihrer CO_2 -Pflanzen wieder.

Tabelle 3.3 Chlorophyll a/b-, Chlorophyll/Carotinoid- und Protein/Chlorophyll Verhältnis isolierter Thylakoidmembranen aus den Tabakpflanzen N.t. var. JWB und Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter (700 ppm) CO_2 -Konzentration.

	JWB Thylakoidmembranen		Su/su Thylakoidmembranen	
	350 ppm CO_2	700 ppm CO_2	350 ppm CO_2	700 ppm CO_2
Chlorophyll a/b	3,2 ± 0,1	3,2 ± 0,2	4,4 ± 0,5	3,6 ± 0,5
Chlorophyll / Carotinoid	4,6 ± 0,2	4,5 ± 0,2	4,1 ± 0,4	4,3 ± 0,4
Protein / Chlorophyll	6,1 ± 0,3	6,5 ± 0,4	17,6 ± 1,2	10,8 ± 1,4

Alter der Pflanzen zur Zeit der Isolierung: JWB: 23 bis 30 Tage, Su/su: 23 bis 40 Tage

Zunächst werden die Ergebnisse für JWB und anschließend für die Tabakmutante Su/su wiedergegeben.

Das mittlere Chlorophyll a/b Verhältnis der isolierten Thylakoidmembranen aus den CO_2 -Pflanzen entspricht dem der Kontrollpräparationen. Auch das Chlorophyll/Carotinoid Verhältnis der CO_2 -Thylakoidmembranen hat gegenüber den Kontrollpräparationen keine Veränderung erfahren.

Die Pigment-Verhältnisse der isolierten Thylakoidmembranen aus den JWB Kontroll- & CO_2 -Pflanzen entsprechen denen für Chloroplasten in Tabelle 3.2. Dies war völlig zu erwarten, da die Thylakoidmembranen in den Chloroplasten den gesamten Photosyntheseapparat der Lichtreaktion der Photosynthese enthalten (siehe Abb.3.5).

Im Durchschnitt liegt das Protein/Chlorophyll Verhältnis der CO_2 -Thylakoidmembranen über dem der Kontrollpräparationen. Zwar fällt dieser Anstieg im Verhältnis Protein zu Chlorophyll (w/w) bei den isolierten Thylakoidmembranen der CO_2 -Pflanzen gegenüber den Kontrollen im Mittel nur gering aus, - es zeigt jedoch den Trend. Während isolierte Chloroplasten der CO_2 -Pflanzen gegenüber denen der Kontrollpflanzen in der Regel ein deutlich kleineres Protein/Chlorophyll Verhältnis aufweisen (siehe Tab. 3.2), steigt das Protein/Chlorophyll Verhältnis der isolierten CO_2 -Thylakoidmembranen gegenüber den entsprechenden Kontrollpräparationen leicht an.

Die Anzucht der Tabakpflanze JWB unter einer erhöhten CO_2 -Atmosphäre führt einerseits zu einer starken Abnahme an Protein in den Chloroplasten und andererseits zu einer Umverteilung an Protein zwischen den Thylakoidmembranen und dem Stroma der Chloroplasten. Das heißt, dass der Anteil der löslichen Proteine in den Chloroplasten der CO_2 -Pflanzen von JWB deutlich abnimmt.

Bei den Kontroll- & CO_2 -Pflanzen von Su/su entspricht das Verhältnis Chlorophyll a zu b (w/w) der Thylakoidmembranen erwartungsgemäß denen der Chloroplasten in Tabelle 3.2. Dagegen fällt das Verhältnis Chlorophyll zu Carotinoid (w/w) in den Thylakoidmembranen der Su/su Kontroll- & CO_2 -Pflanzen im Mittel signifikant größer aus als bei den Chloroplastenpräparationen (siehe Tabelle 3.2). Ein großer Teil der Carotinoide in den Chloroplasten der Mutante Su/su ist nicht oder nur locker an den Thylakoidmembranen gebunden, und scheint an anderen Strukturen wie etwa Proteinvesikeln im Stroma der Chloroplasten gebunden zu sein. Während das Chlorophyll a/b Verhältnis der isolierten Thylakoidmembranen aus den CO_2 -Pflanzen gegenüber den Kontrollpräparationen um 18 % kleiner ausfällt, bleibt das Chlorophyll/Carotinoid Verhältnis konstant.

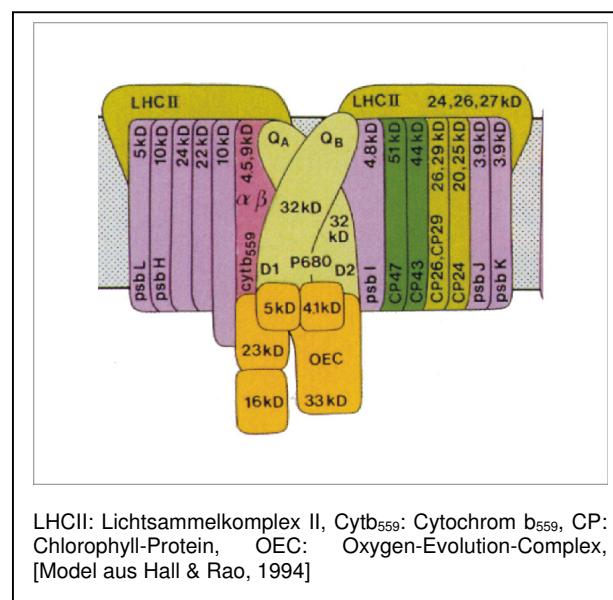
Die starke Reduzierung des mittleren Protein/Chlorophyll Verhältniswertes der Su/su CO_2 -Thylakoidmembranen um über 35 % gegenüber den Kontrollpräparationen in Tabelle 3.3 entspricht dem Trend bei den Chloroplasten in Tabelle 3.2.

Die Anzucht der Tabakmutante Su/su unter einer erhöhten CO_2 -Atmosphäre von 700 ppm führt zu einer drastischen Reduzierung der Proteinkonzentration in den Thylakoidmembranen.

d) PS II-Membranen

In dieser Arbeit wurden Photosystem II-Membranen aus den Kontroll- & CO₂-Pflanzen der beiden Tabakpflanzen JWB und Su/su isoliert. Es handelt sich dabei um Membranbereiche der Grana, die mit Hilfe des Detergenz Triton X-100 von den Stromathylakoiden getrennt und über eine Ultrazentrifugation isoliert werden. Eine weitere Inkubation dieser Membranen mit Triton X-100 und eine anschließende Ultrazentrifugation löst noch vorhandene Photosystem I-Komplexe aus den Granathylakoiden. Die auf diese Art isolierten Granamembranen werden auch **PS II-Membranen** genannt. In ihnen sind die Photosystem II-Komplexe eingebettet. Die folgende Abbildung zeigt ein Model von Photosystem II [Hall & Rao, 1994].

Abb. 3.7 Model eines Photosystem II-Komplexes



Das in der Abbildung 3.7 dargestellte Model eines Photosystem II-Komplexes kann man in drei Komponenten aufteilen. Es besteht aus dem multimeren Lichtsammlersystem LHC II, dem sogenannten Antennenkomplex, und dem Kern-(engl.: Core-) Komplex (KK) mit dem Reaktionszentrum (RZ). Dieses ist durch den wasserspaltendem bzw. sauerstoffentwickelnden Komplex (engl.: oxygen-evolving-complex (OEC)) erweitert. Am Aufbau sind insgesamt etwa 26 verschiedene Proteine beteiligt [Richter, 1996]. Der LHC II absorbiert Lichtenergie aus weiten Teilen des sichtbaren Spektrums und leitet es zur sogenannten *inneren Lichtantenne* des PS II, welches aus den Chlorophyll-bindenden Proteinen CP 47 und CP 43 gebildet werden. Diese proximale Lichtantenne leitet die absorbierte Lichtenergie auf das Reaktionszentrum von PS II. Dieses besteht aus den Proteinuntereinheiten D1 und D2 (D: steht für diffus, da die beiden Peptide in der SDS-Gelelektrophorese als diffuse Banden auftreten) [Richter, 1996]. Im Reaktionszentrum befindet sich das P680 (Pigment 680). Es

handelt sich dabei um ein Chlorophyll a-Dimer [Barber, 1987]. Zusätzlich sind 4 weitere Chlorophyll a-Moleküle, 2 Moleküle Pheophytin a, 2 Moleküle β -Carotin sowie 2 Moleküle Plastochinon, Q_a mit fester Bindung am D2 und Q_b mit reversibler Anheftung an D1 gebunden. Der Elektronentransport im Photosystem II verläuft von Wasser über P680, dann weiter über die beiden Pheophytin a-Moleküle zu den beiden Plastochinone Q_a und Q_b . Der Minimalkomplex des Photosystem II, welcher in der Lage ist die photochemische Ladungstrennung zu vollziehen, besteht aus den Proteinen D1, D2 und einem Cytochrom vom b-Typ, dem Cytochrom b_{559} [Nanba und Satoh, 1987]. Dieser Komplex ist aber nicht in der Lage Wasser zu spalten. Der Minimalkomplex, der neben der Ladungstrennung auch in der Lage ist Wasser zu spalten, benötigt CP43 und CP47 und die drei extrinsischen Proteine des wasserspaltendem Komplex mit den Molekularmassen 33 kDa, 23 kDa und 16 kDa. Dazu kommen noch zwei weitere kleinere Proteine mit den Molekülmassen 5- und 4,1 kDa, deren Funktion noch nicht klar ist [Richter, 1996]. Der wasserspaltende Komplex ist in der Abbildung 3.7 orange dargestellt. Im Photosystem II-Komplex kommen noch eine Vielzahl weitere Proteine vor, deren Funktion zum größten Teil noch nicht geklärt ist.

Die folgende Tabelle 3.4 gibt das Chlorophyll a/b- (w/w), Chlorophyll/Carotinoid- (w/w) und das Protein/Chlorophyll Verhältnis (w/w) von Photosystem II-Membranen (PS II-Membranen) aus den beiden Tabakpflanzen JWB und der Mutante Su/su und ihrer CO_2 -Pflanzen wieder.

Tabelle 3.4 Chlorophyll a/b-, Chlorophyll/Carotinoid- und Protein/Chlorophyll Verhältnis isolierter PS II-Membranen aus den Tabakpflanzen N.t. var. JWB und Su/su, angezogen unter natürlicher (350 ppm) und erhöhter (700 ppm) CO_2 -Konzentration.

	JWB PS II-Membranen		Su/su PS II-Membranen	
	350 ppm CO_2	700 ppm CO_2	350 ppm CO_2	700 ppm CO_2
Chlorophyll a/b	2,4 $\pm 0,11$	2,3 $\pm 0,13$	3,5 $\pm 0,41$	3,1 $\pm 0,31$
Chlorophyll / Carotinoid	4,6 $\pm 0,14$	4,7 $\pm 0,16$	4,8 $\pm 0,27$	4,7 $\pm 0,15$
Protein / Chlorophyll	4,9 $\pm 1,3$	4,8 $\pm 1,3$	6,5 $\pm 1,22$	4,5 $\pm 1,1$

Alter der Pflanzen zur Zeit der Isolierung: JWB: 23 bis 30 Tage, Su/su: 23 bis 40 Tage

Das Chlorophyll a/b Verhältnis der JWB CO_2 PS II-Membranen zeigt keine Veränderung gegenüber dem der Kontrollpräparationen. Das Verhältnis Chlorophyll a zu b (w/w) bei den PS II-Membranen der Kontroll- & CO_2 -Pflanzen entspricht den üblichen Werten, die man beim Wildtyp JWB findet [S. Specht, 1989]. Die isolierten PS II-Membranen der CO_2 -Pflanzen zeigen gegenüber den entsprechenden Kontrollanzuchten keine Unterschiede im

Chlorophyll/Carotinoid Verhältnis (w/w). Dieses Ergebnis entspricht dem Trend der vorherigen Tabellen beim Wildtyp JWB.

Es treten keine signifikanten Unterschiede im Chlorophyll a/b- und im Chlorophyll/Carotinoid Verhältnis zwischen den PS II-Membranen der JWB Kontroll- & CO₂-Pflanzen auf. Auch der Vergleich der Protein/Chlorophyll Verhältnisse (w/w) zwischen den PS II-Membranen der Kontroll- & CO₂-Pflanzen zeigt keine Veränderung auf.

Bei der Tabakmutante Su/su liegt das Chlorophyll a/b Verhältnis der *CO₂ PS II-Membranen* unter dem der Kontrollpräparationen und entspricht dem Trend, wie man ihn von den Blättern, Chloroplasten und Thylakoidmembranen her kennt. Die Differenz ist nicht so hoch wie bei den vorhergehenden Vergleichen. Das Chlorophyll a/b Verhältnis der isolierten PS II-Membranen der Kontrollanzuchten in Tabelle 3.4 entspricht dem üblichen Mittelwert aus früheren Arbeiten [S. Specht, 1989]. Das Chlorophyll/Carotinoid Verhältnis der Su/su PS II-Membranen weist zwischen den Kontroll- & CO₂-Pflanzen keine Unterschiede auf und liegt im selben Bereich wie das der PSII-Membranen des Wildtyps JWB. Das Protein/Chlorophyll Verhältnis der Su/su *CO₂ PS II-Membranen* liegt jedoch mit 4,5 im Mittel deutlich unter dem der Kontrollpräparation mit 6,5.

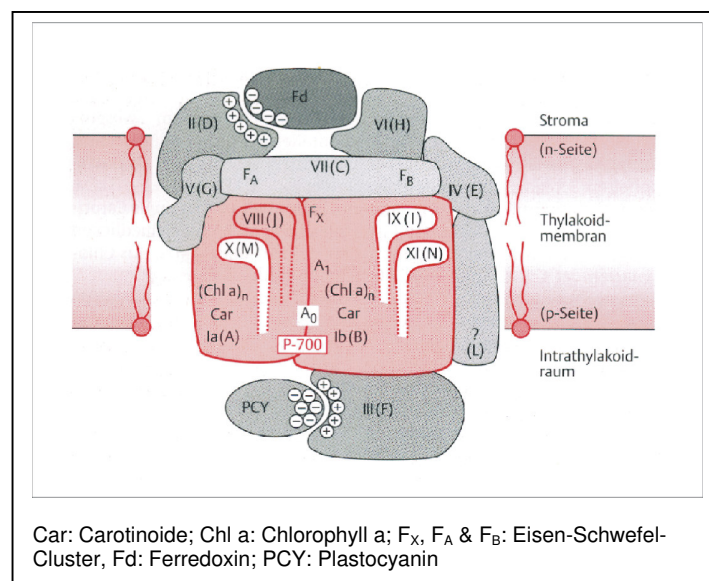
Damit führt die Anzucht der chlorophyllarmen Mutante Su/su unter einer erhöhten CO₂-Atmosphäre von 700 ppm zu einer Reduzierung des Proteingehaltes in den PS II-Membranen.

e) **PS I-Komplex**

Das Photosystem I ist ein multimerer Pigment-Protein-Komplex, der wie das Photosystem II die Thylakoidmembran durchspannt. Es katalysiert den lichtbetriebenen Elektronentransport von Plastocyanin, einem Kupferprotein vom Typ 1, nach Ferredoxin. Ferredoxin gehört zur Gruppe der Eisen-Schwefel-Proteine, den sogenannten Nicht-Häm-Eisenproteinen. Seine apparente Molekülmasse beträgt 10 kDa. Es agiert als bewegliche Elektronentransportkomponente an der Stromaseite der Thylakoidmembran. Reduziertes Ferredoxin liefert die Elektronen für die Reduktion von NADP⁺ zu NADP-H + H⁺. Diese Reaktion wird von der Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase katalysiert [Richter, 1996]. Das Photosystem I kann wie das Photosystem II in ein Lichtsammlersystem, auch LHC I genannt, und in einen Kern-(Core) Komplex mit dem Reaktionszentrum (RZ) aufgegliedert werden. Mullet [1980] hat diesen Komplex auch als den *nativen PS I-Komplex* bezeichnet. Er konnte aufzeigen, dass der LHC I aus der Erbse aus vier Proteinen mit den apparenten Molekülmassen von 22,5 kDa bis 24, 5 kDa besteht. Weitere LHC I-Komplexe wurden aus Spinat [Lam et al., 1984], aus *Lemna gilba* [Nechushtai et al., 1987], Gerste [Bassi & Simpson, 1987] und aus Mais [Vainstein et al., 1989] isoliert. All diese LHC I-Komplexe sind hauptsächlich aus drei Proteinen mit apparenten Molekülmassen von 17 kDa bis 26 kDa aufgebaut. Bei Mais besteht der LHC I aus drei pigmentbindenden Proteinen mit den Molekularmassen von 17 kDa, 21

kDa und 24 kDa [Vainstein et al., 1989]. Das Verhältnis Chlorophyll a zu b (w/w) des LHC I ist im Vergleich zum LHC II größer. Das Lichtantennensystem des Photosystem I (LHC I) enthält weniger Chlorophyll b [Schmid, 1993]. Als integrale Bestandteile des PS I-Kern (Core) Komplexes sind mindestens 12 Polypeptide ermittelt worden. Die Abbildung 3.8 zeigt ein Modell des Core-Komplexes [Richter, 1996]. Die Anordnung der einzelnen Polypeptide stimmt in diesem Modell nur teilweise mit dem *In-vivo*-Aufbau überein. Die einzelnen Proteine des PS I-Core-Komplexes sind gemäß ihrer abnehmenden relativen molekularen Masse mit Ia, Ib bis XI bezeichnet worden [nach Bengis & Nelson, 1975, 1977].

Abb. 3.8 Model eines Photosystem I- Kern-(Core) Komplexes.



Die Bezeichnung der einzelnen Untereinheiten im Photosystem I nach ihrer relativen molekularen Masse kann zu Verwechslung einiger Untereinheiten führen, da die verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche Gelsysteme zur Bestimmung der apparenten Molekularmassen benutzen und äquivalente Proteine aus verschiedenen Organismen im gleichen Gelsystem unterschiedlich wandern. Daher wurde auf dem Photosynthese-Kongress in Stockholm (1989) eine andere Nomenklatur vorgeschlagen. Diese beruht auf der Identifizierung der verschiedenen für die PS I-Untereinheiten kodierenden Gene. Das Reaktionszentrum des PS I wird durch die beiden großen Untereinheiten Ia (als Genprodukt PsaA bezeichnet) und Ib (PsaB) mit den Molekülmassen von 83,2- und 82,5 kDa [Fish et al., 1985] gebildet. Das Reaktionszentrum des PS I wird auch als CP1 (Chlorophyll-Protein 1) bezeichnet [Thornber, 1986]. An diesem Heterodimer (PsaA/B) ist das P700, ein Chlorophyll a- Monomer oder Dimer, das Reaktionspigment des Reaktionszentrums, gebunden. Zusätzlich sind die Elektronenakzeptoren A₀ (Chlorophyll a, Monomer oder Dimer ?) [Gast et al., 1983], A₁ (Phyllochinon, Vitamin K1) [Malkin, 1986] und A₂ (ein Eisen-Schwefel-Cluster, in der Abb. 3.8 als F_x bezeichnet) [Scheller et al., 1989] am Reaktionszentrum gebunden.

Desweiteren sind bis zu 100 Chlorophyll a Moleküle an den beiden Untereinheiten des Reaktionszentrums gebunden. Sie fungieren als innere Lichtantenne von PS I. Die Elektronen werden vom A₂ auf zwei weitere Elektronenakzeptoren A₃ und A₄ (Eisen-Schwefel-Cluster, in der Abb. 3.8 als F_A und F_B bezeichnet) übertragen. Diese befinden sich auf der Untereinheit VII (C, PsaC). Von dort gelangen die Elektronen auf das stromaseitige bewegliche Ferredoxin. Die Anbindung des Ferredoxin an das PS I wird wahrscheinlich über die Untereinheit II (D, PsaD) vermittelt. Die Untereinheit III (F, PsaF) vermittelt die Anheftung des beweglichen Elektronendonors Plastocyanin an der luminalen Seite des PS I. Die Funktion der anderen Untereinheiten im PS I-Kern (Core) Komplex ist noch unklar. Die stromaseitig aufliegende Untereinheit VI (H, PsaH) findet man nur in Höheren Pflanzen und in *Chlamydomonas reinhardtii* [Steppuhn et al., 1989; Franzen et al., 1989]. Möglicherweise spielt diese Untereinheit eine Rolle bei der Bindung des LHC I an den PS I-Core-Komplex [Steppuhn et al., 1989].

Die Tabelle 3.5 gibt das Chlorophyll a/b- (w/w), Chlorophyll/Carotinoid- (w/w) und das Protein/Chlorophyll (w/w) Verhältnis isolierter PS I-Komplexe der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su und ihrer *CO₂-Pflanzen* wieder. Die PS I-Komplexe sind nach einer Methode von Wynn & Malkin [1988] in leicht modifizierter Form isoliert worden.

Tabelle 3.5 Chlorophyll a/b-, Chlorophyll/Carotinoid- und Protein/Chlorophyll Verhältnis isolierter PS I-Komplexe aus den Tabakpflanzen N.t.var. JWB und Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter (700 ppm) CO₂-Konzentration.

	JWB PS I-Komplexe		Su/su PS I-Komplexe	
	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂
Chlorophyll a/b	2,05 ± 0,14	2,1 ± 0,22	5,2 ± 0,28	2,8 ± 0,3
Chlorophyll / Carotinoid	4,7 ± 0,29	4,7 ± 0,23	5,2 ± 0,24	4,65 ± 0,24
Protein / Chlorophyll	2,3 ± 0,24	3,3 ± 0,16	6,9 ± 1	5,85 ± 1,5

Aus der Tabelle 3.5 kann entnommen werden, dass das Chlorophyll a/b Verhältnis der isolierten PS I-Komplexe aus den *CO₂-Pflanzen* des Wildtyps JWB im selben Bereich wie das der Kontrollanzuchten liegt. Es entspricht den üblichen Chlorophyll a/b Verhältnissen isolierter PS I-Komplexen aus früheren Arbeiten [Makewicz et al, 1995a]. Auch das Chlorophyll/Carotinoid Verhältnis der isolierten PS I-Komplexe aus den *CO₂-Pflanzen* zeigt keine Unterschiede zu den Kontrollpräparationen. Einzig und allein das Verhältnis Protein zu Chlorophyll ist bei den PS I-Präparationen aus den *CO₂-Pflanzen* deutlich größer. Der

Vergleich der Verhältnisse zwischen den PS I-Präparationen aus der *Kontroll- & CO₂-Pflanze* des Wildtyps JWB bestätigt den allgemeinen Trend bei der Wildform.

Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in den Verhältnissen Chlorophyll a/b und Chlorophyll/Carotinoid der verschiedenen Präparationen (Blatt, Chloroplasten, Thylakoidmembranen, PS II-Membranen und PS I-Komplexe) aus den Kontroll- & CO₂-Pflanzen des Wildtyps JWB. Dagegen ist das Protein/Chlorophyll Verhältnis der PS I-Präparationen aus den *CO₂-Pflanzen* des Wildtyps gegenüber den Kontrollpräparationen, wie bei den anderen Versuchsmaterialien, deutlich verschoben.

Die Anzucht des Tabakwildtyps JWB unter einer erhöhten CO₂-Atmosphäre von 700 ppm führt zu einem Anstieg der Proteinmenge im Photosystem I.

Das Chlorophyll a/b Verhältnis der *CO₂ PS I-Komplexen* von Su/su fällt gegenüber den Kontrollpräparationen drastisch ab (siehe Tab.3.5).

Die Abnahme des Chlorophyll a/b Verhältnisses in den CO₂ PS I-Komplexen von Su/su signalisiert eine starke Zunahme der äußeren Lichtsammelantenne am PS I. Gleichzeitig nimmt der Anteil der PS I-Kern (Core) Komplexe ab. Während das Chlorophyll /Carotinoid Verhältnis der nativen PS I-Komplexe aus den *CO₂-Pflanzen* der Mutante Su/su mit 4,65 im Bereich der entsprechenden Präparationen aus dem Wildtyp JWB liegt, weisen die PS I-Komplexe der Kontrollanzuchten mit 5,21 ein etwas größeres Chlorophyll /Carotinoid Verhältnis auf. Das Protein/Chlorophyll Verhältnis der *CO₂-PS I-Komplexe* ist im Mittel um 15 % kleiner als das der Kontrollpräparationen.

Bei der Mutante Su/su führt die Anzucht unter erhöhtem CO₂ (700 ppm) zu einer starken strukturellen Veränderung im Photosystem I.

3.4 Bestimmung der Carotinoidzusammensetzung in den Blättern der Tabakpflanzen N.t. var. JWB und Aureamutante Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm).

Die im Ergebnisteil 3.3 aufgeführten Carotinoidwerte der verschiedenen Präparationen wurden über die Carotinoidabsorption bei 430 nm (Soretbande) abzüglich der Chlorophyllabsorption bei dieser Wellenlänge berechnet. Diese Methode ist recht einfach und schnell auszuführen. Sie gibt aber nicht die Zusammensetzung der einzelnen Carotinoide untereinander wieder. Hierfür wurden die Blätter mit definierter Größe in 100 % Methanol bis auf 60° Celsius erhitzt, um eine vollständige Herauslösung der Carotinoide aus dem Blattmaterial zu erreichen. Nach der Verseifung des Methanolextraktes mit 0,5 n methanolische NaOH-Lösung lassen sich die Carotinoide leicht ausschütteln. Nach der Neutralisierung der Carotinoidlösung werden diese in einer definierten Menge Ethanol aufgenommen und der *High-Pressure-Liquid-Chromatographic-Analyse* (HPLC) zugeführt.

Ausgehend von den bisherigen Ergebnissen über die spezifische Verteilung der einzelnen Carotinoide im Photosyntheseapparat Höherer Pflanzen und deren Funktion, kann über die Veränderung in der Verteilung der einzelnen Carotinoide zueinander, die an den beiden Photosystemen gebunden sind, auf strukturelle Veränderung im Photosyntheseapparat geschlossen werden.

Am Reaktionszentrum vom PS I (psa A/B Genprodukt) sind 14 β -Carotin-Moleküle gebunden. Makewicz et al. [1995a] finden im Photosystem I Kern- (Core) Komplex aus der Tabakpflanze JWB 16 Moleküle β -Carotin. Am nativen PS I-Komplex (PS I-Kern (Core)-Komplex + LHC I) sind insgesamt 27 β -Carotin-Moleküle gebunden [Anderson et al., 1983; Bengis and Nelson, 1975; Setif et al., 1980]. Demnach sind am LHC I 13 Moleküle β -Carotin gebunden [Siefermann-Harms, 1985].

Am PS II sind nach Bassi [1993] ca. 10 β -Carotin-Moleküle gebunden. Pro LHC II sind 5 Moleküle β -Carotin gebunden [Bassi et al., 1993; Kühlbrand et al., 1994]. Nach Gounaris et al. [1990] sind pro D1/D2 Heterodimer (Reaktionszentrum von PS II) 1 bis 2 β -Carotin-Moleküle gebunden. Die Xanthophylle Lutein, Violaxanthin und Neoxanthin sind ausschließlich an den pigmentbindenden Proteinen des Photosyntheseapparates lokalisiert, welche der Lichtsammlung dienen. Auch bei den Xanthophyllen scheint die Verteilung auf die pigmentbindenden Proteine des Photosyntheseapparats spezifisch zu sein. Lutein findet man am CP43 und CP47 von PS II, am LHC II und am LHC I. Pro LHC I ist mit ca. 24 Molekülen der größte Teil des Lutein gebunden [Siefermann-Harms, 1985]. Violaxanthin ist am CP43 und am CP47 von PS II, am LHC II und am LHC I gebunden. Am LHC I scheint mit 9 Molekülen Violaxanthin pro LHC I der größte Teil des Violaxanthin gebunden zu sein [Siefermann-Harms, 1985]. Bassi et al. berechnet den Anteil an Violaxanthin, der am vollständigem PS II (PS II-Membranen) gebunden ist, nur auf 3,7 Moleküle. Neoxanthin scheint dagegen deutlich mehr an PS II gebunden zu sein [Bassi et al., 1993]. Ob Neoxanthin am nativem PS I-Komplex (PS I-LHC I) überhaupt gebunden ist, bleibt offen, da nach Henry et al. (1983) kein Neoxanthin in Stromathylakoidmembranen gefunden wurde. Die Angaben über den Neoxanthingehalt pro nativem PS I-Komplex schwankt zwischen 0 und 2 Molekülen [Anderson et al., 1983; Bengis and Nelson, 1975; Markewicz et al., 1995; Setif et al., 1980]. Möglicherweise könnte das Neoxanthin über den mobilen Teil des LHC II am nativem PS I-Komplex gebunden sein.

Trotz einiger Unsicherheiten zeigen die Ergebnisse der bisherigen Forschung über die Verteilung der Carotinoide an den pigmentbindenden Proteinen des Photosyntheseapparats deutliche Tendenzen auf. Mag man sich auch noch über die genaue Anzahl an Carotinoidmolekülen pro Photosystem I & II streiten, es gilt als relativ sicher, dass nur β -Carotin an den Reaktionszentren von Photosystem I & II gebunden ist. Die Xanthophylle Lutein, Violaxanthin und Neoxanthin scheinen nur an den lichtsammelnden Pigment-Protein-Komplexen der beiden Photosysteme gebunden zu sein. Ihre hauptsächliche Aufgabe ist die der Lichtsammlung. Sie absorbieren im spektralen Bereich des Lichtes, der von den Chlorophyllen nicht absorbiert wird, und verbreitern somit das spektrale Wirkungsspektrum

der Photosynthese. Außerdem wird den Carotinoiden auch eine Schutzfunktion gegen Photooxidation zugewiesen [Siefermann-Harms, 1987].

Violaxanthin steht über den Violaxanthin-Zyklus mit dem Xanthophyll Zeaxanthin in Verbindung. Als Zwischenprodukt entsteht Antheraxanthin [Yamamoto et al., 1962]. Zeaxanthin wird bei Höheren Pflanzen immer dann in nennenswerter Konzentration im Blattmaterial gefunden, wenn diese unter hohen Lichtintensitäten aufwachsen oder wenn die photochemische Kapazität der Pflanzen generell niedrig ist [Demming-Adams et al., 1995]. Die Aufgabe des „Violaxanthophyll-Zyklus“ ist im Gefüge der *NRD-Regulation von Photosystem II (PS II)* eingebettet. Die angloamerikanische Abkürzung *NRD* bedeutet *Non-Radiation-Dissipation* von Lichtenergie im PS II. Dabei wird überschüssige Lichtenergie auf eine *non-radiative* Weise vom Reaktionszentrum des Photosystem II (PS II) abgeleitet. Der genaue Mechanismus ist noch wenig verstanden [Yamamoto and Bassi, 1996].

Lutein nimmt innerhalb der gebundenen Carotinoide den größten Anteil ein, gefolgt vom β -Carotin. Violaxanthin ist stärker im Photosystem I vertreten, während Neoxanthin möglicherweise fast ausschließlich am Photosystem II gebunden ist.

Im folgenden wurde der Gehalt an Neoxanthin, Violaxanthin, Lutein und β -Carotin in den Blättern der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su und ihrer *CO₂-Pflanzen* analysiert. Die Tabelle 3.6 gibt die Carotinoidverteilung bezogen auf 1cm² Blatt wieder.

Tabelle 3.6 Zusammensetzung der Carotinoide in den Blättern der Tabakpflanzen N.t.var. JWB und Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm).

Carotinoid: [$\mu\text{g} / \text{cm}^2$]	JWB-Blatt		Su/su-Blatt	
	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂
Neoxanthin	0,133	0,233	0,003	0,003
Violaxanthin	0,244	0,191	0,035	0,045
Lutein	2,316	2,53	0,374	0,336
β -Carotin	0,615	0,745	0,247	0,253
Gesamtmenge	3.308	3,7	0,659	0,637

Alter der Pflanzen: JWB: 22 Tage Su/su: 26 Tage

Das Ergebnis der Tabelle 3.6 ist, dass die Anzucht der beiden Tabakpflanzen unter einer erhöhten CO₂-Atmosphäre (700 ppm) eine Veränderung in der Verteilung der Carotinoide im Blattgewebe bewirkt.

Bei dem Wildtyp JWB steigt der Anteil an Neoxanthin im Blattgewebe der *CO₂-Pflanzen* beträchtlich an, während das Xanthophyll Violaxanthin deutlich abnimmt. Lutein nimmt im

CO₂-Blatt leicht zu. Das Carotinoid β -Carotin steigt im Blatt der *CO₂-Pflanze* ebenfalls deutlich an. Die Gesamtmenge der vier Carotinoide ist im Blattgewebe der *CO₂-Pflanzen* um 10 % höher und entspricht im Trend dem Ergebnis der Tabelle 3.1 [Chlorophyll-, Carotinoid- und Proteinbestimmung von Blättern der Tabakpflanze JWB und Su/su, angezogen unter ambienter (350 ppm) und erhöhter (700 ppm) *CO₂-Konzentration*]. Es sei noch einmal erwähnt, dass die Carotinoidwerte in Tabelle 3.1 über die allgemeine Carotinoidabsorption (bei 430 nm) abzüglich der Chlorophyllabsorption berechnet wurden.

Bei der chlorophyllarmen Mutante Su/su zeigen sich keine so großen Unterschiede in der Zusammensetzung der Carotinoide im Blattgewebe zwischen den Kontroll- & *CO₂-Pflanzen*. Im Blattgewebe der *CO₂-Pflanzen* nimmt der Gehalt an Violaxanthin pro cm² Blatt um über 20 % zu. Der Gehalt an Neoxanthin und β -Carotin wird durch die Anzucht der Tabakmutante Su/su unter einer erhöhten *CO₂-Atmosphäre* nicht beeinflusst. Das Xanthophyll Lutein fällt im Blattgewebe der *CO₂-Pflanze* um 10 % ab.

Im Vergleich zum Tabakwildtyp JWB hat die chlorophyllarme Mutante Su/su praktisch kein Neoxanthin und kein Violaxanthin. Generell fallen die Werte für die einzelnen Carotinoide bei der Aureamutante Su/su gegenüber dem Wildtyp JWB beträchtlich kleiner aus.

Um die Verschiebung der Carotinoidverteilung in den Blättern der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su bei Wachstum unter einer erhöhten *CO₂-Atmosphäre* (700 ppm) besser zu verdeutlichen, gibt die folgende Tabelle die Verhältnisse β -Carotin zu Lutein (w/w) und β -Carotin zu Xanthophyll (w/w) wieder.

Tabelle 3.7 Verhältnis β -Carotin zu Lutein (w/w) und β -Carotin zu Xanthophyll (w/w) im Blattgewebe der beiden Tabakpflanzen N.t.var. JWB und Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter *CO₂-Konzentration* (700 ppm).

	JWB-Blatt		Su/su-Blatt	
	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂
β -Carotin / Lutein	0,26	0,29	0,66	0,75
β -Carotin / Xanthophyll	0,23	0,25	0,6	0,66

Bei dem Wildtyp JWB nehmen die Verhältnisse β -Carotin/Lutein und β -Carotin/Xanthophyll im Blattgewebe der *CO₂-Pflanze* um 10 % leicht zu.

Bei der chlorophyllarmen Mutante Su/su nimmt das Verhältnis β -Carotin/Lutein im *CO₂-Blatt* um 13 % und das Verhältnis β -Carotin/Xanthophyll um 10 % zu.

Generell sind die Verhältniswerte von β -Carotin/Lutein- und von β -Carotin/Xanthophyll der Su/su-Blätter gegenüber den Blättern des Wildtyps JWB 3 mal höher. Da die chlorophyllarme Mutante Su/su eine deutliche Reduzierung des LHC in den Thylakoidmembranen aufweist [Schmid und Gaffron, 1967], muß das Verhältnis β -Carotin/ Lutein und β -Carotin/Xanthophyll in den Thylakoidmembranen der Mutante Su/su gegenüber dem Wildtyp JWB deutlich größer ausfallen. Denn während die Xanthophylle Lutein, Violaxanthin und Neoxanthin fast ausschließlich am LHC und am CP43 und CP48 des PS II (innere Lichtantenne des PS II) gebunden sind, findet man das Carotinoid β -Carotin auch an den Reaktionszentren von PS II und PS I [Bassi et al., 1993; Gounaris et al., 1990; Kühlbrandt et al., 1994; Anderson et al., 1983; Bengis and Nelson, 1975; Siefermann-Harms, 1985; Thornber et al., 1993].

Die Frage stellt sich, welche Aussagen sich aus der Bestimmung der Verteilung der einzelnen Carotinoide untereinander im Blattgewebe der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su im Bezug auf mögliche Veränderungen im Photosyntheseapparat ihrer *CO₂-Pflanzen* ableiten lassen. Wie schon weiter oben beschrieben, weisen die Verhältnisse β -Carotin/Lutein und β -Carotin/Xanthophyll in den Blättern der Su/su Kontroll-Pflanzen gegenüber denen des Wildtyps JWB deutlich höhere Werte auf. Dies ist zu erwarten gewesen, da die Mutante Su/su eine starke Reduzierung des LHC in den Thylakoidmembranen aufweist. Das Verhältnis Reaktionszentren (PS I & PS II) zu LHC (LHC I & II) ist bei der Mutante Su/su gegenüber dem Wildtyp JWB signifikant in Richtung der photosynthetischen Reaktionszentren verschoben. Da nur das Carotinoid β -Carotin an den Reaktionszentren als auch am LHC I und II gebunden ist, müssen also die Verhältnisse β -Carotin/Lutein und β -Carotin/Xanthophyll deutlich höhere Werte aufweisen als beim Wildtyp.

In diesem Sinne kann der Anstieg der Verhältniswerte β -Carotin/Lutein und β -Carotin/Xanthophyll im Blattgewebe der JWB *CO₂-Pflanzen* gegenüber den Kontrollpflanzen als ein Indiz für eine Veränderung im Verhältnis Reaktionszentren (PS II & PS I) zu LHC (I & II) in den Thylakoidmembranen der *CO₂-Pflanzen* in Richtung Reaktionszentren gedeutet werden.

Bei der chlorophyllarmen Mutante Su/su steigen die beiden Verhältniswerte im Blattgewebe der *CO₂-Pflanzen* gegenüber der entsprechenden Kontrollanzucht an (siehe Tabelle 3.7). Der Anstieg der Verhältniswerte β -Carotin/Lutein und β -Carotin/Xanthophyll im Blattgewebe der *CO₂-Pflanzen* um 13 % und 10 % könnte ebenfalls als ein Anstieg der photosynthetischen Reaktionszentren (PS II & PS I) in den Thylakoidmembranen verstanden werden. Da aber das Chlorophyll a/b Verhältnis der *CO₂-Blätter* gegenüber den Kontroll-Blättern signifikant niedriger ausfällt, nämlich im Mittel um 15 %, muß die eben beschriebene Interpretation bei der Mutante Su/su kritisch hinterfragt werden. Denn die Zunahme des Chlorophyll b im Blattgewebe der *CO₂-Pflanzen* gegenüber den Kontrollanzuchten bei unveränderten Gesamtchlorophyllgehalt pro cm² Blatt (siehe Tabelle 3.1) deutet auf eine starke Zunahme des

LHC (I & II) bei gleichzeitiger Reduktion der photosynthetischen Reaktionszentren (PS II & PS I) in den Thylakoidmembranen der *CO₂-Pflanzen* hin.

Dieser offensichtliche Widerspruch kann aufgelöst werden:

Aus dem Vergleich der Chlorophyll/Carotinoid Verhältniswerte der Su/su Kontroll- & *CO₂*-Blätter im Ergebnisteil 3.3 (Chlorophyll-, Carotinoid- und Proteinbestimmung) mit den Thylakoidpräparationen der Su/su Kontroll- & *CO₂*-Pflanzen wird deutlich, dass ein Teil der Carotinoide in den Chloroplasten der chlorophyllarmen Mutante Su/su (dieses gilt auch für die *CO₂-Pflanzen*) möglicherweise lose an den Thylakoidmembranen gebunden ist, die dann bei der Isolierung der Thylakoidmembranen verloren gehen. Es ist aber auch durchaus denkbar, dass ein Teil der Carotinoide an oder in anderen lipophilen Strukturen wie etwa der äußeren Chloroplastenmembran oder in den Plastoglobuli [Lichterntaler, 1969] gebunden sind.

Dies gilt auch für den Wildtyp JWB,- wenn auch nicht so ausgeprägt. Im Durchschnitt ist das Verhältnis Chlorophyll zu Carotinoid im Blattgewebe und auch bei den Chloroplastenpräparationen kleiner als bei den Thylakoid-, PS I- und PS II-Präparationen.

Aus diesem Grunde wurde auch die Carotinoidverteilung isolierter Thylakoidmembranen beider Tabakpflanzen JWB und Su/su und ihrer *CO₂-Pflanzen* untersucht. Im nächsten Abschnitt 3.5 werden die Ergebnisse dargestellt.

3.5 Carotinoid-, Plastochinon- und Fettsäuren-Bestimmung im Gesamtlipidextrakt, isolierter Thylakoidmembranen der Tabakpflanzen JWB und Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter *CO₂*-Konzentration (700 ppm).

3.5.1 Reinheitstest der isolierten Thylakoid-Lipide auf Phosphatidylethanolamin.

Die Thylakoidmembranen in den Chloroplasten Höherer Pflanzen enthalten bis zu 75 % Galaktolipide [M. Frentzen und E. Heinz, 1983]. Dabei stellt das Monogalaktosyldiglycerid (MGDG) mit bis zu 50 % den größten Anteil der Thylakoidlipide dar. Digalaktosyldiglycerid (DGDG) kommt bis zu 30 % in den Thylakoidmembranen vor. Die Phospholipide Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidylcholin (PC) stellen insgesamt bis zu 15 % der Lipide in den Thylakoidmembranen dar. Das Sulfolipid Sulfochinovosyldiglycerid kommt bis zu 5 % in den Membranlipiden der Thylakoide vor [M. Frentzen und E. Heinz, 1983]. In dieser Aufstellung sind nur die strukturgebenden Membranlipide aufgelistet. Bei der Extraktion der Lipide aus den nativen Thylakoidmembranen mit organischen Lösungsmitteln werden natürlich auch die Chlorophylle, Carotinoide, der gesamte Plastochinonpool und alle lipidlöslichen Komponenten der Thylakoidmembranen mit isoliert. Diese stellen aber nicht die Matrix der Membranlipide dar, sondern sind zum Teil Komponenten des Photosyntheseapparates.

Es ist schon erstaunlich, daß das Phosphatidylethanolamin (PE), welches in vielen Biomembranen die größte Lipidkomponente ist, in Thylakoidmembranen, die den größten prozentualen Anteil an der gesamten Biomembranfläche einer photosynthetischen Mesophyllzelle einnehmen, nicht enthalten ist [M. Frentzen und E. Heinz, 1983].

Demnach ist der Nachweis von Phosphatidylethanolamin in der Thylakoidmembranfraktion auf eine Verunreinigung durch andere Membransysteme zurückzuführen. Saubere Thylakoidmembranen dürfen kein PE enthalten.

Um zu testen, ob im Gesamtlipidextrakt der isolierten Thylakoidmembranen der beiden Tabakpflanzen JWB und der chlorophyllarmen Mutante Su/su und ihrer *CO₂-Pflanzen* Phosphatidylethanolamin vorhanden ist, wurde der jeweilige Lipidextrakt dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und anschließend mit Ninhydrinreagenz besprüht.

Bei allen Lipidextraktionen der isolierten Thylakoidmembranen fiel die Reaktion mit Ninhydrin negativ aus. Die isolierten Thylakoidmembranen der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su und ihrer jeweiligen *CO₂-Pflanzen* sind frei von anderen Membranverunreinigungen.

3.5.2 *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) Analyse der Pigmentverteilung im Gesamtlipidextrakt isolierter Thylakoidmembranen.

Wie schon im Ergebnisteil 3.4 beschrieben, kann ausgehend von den bisherigen Ergebnissen über die spezifische Verteilung der einzelnen Carotinoide im Photosyntheseapparat Höherer Pflanzen und deren Funktion [H.Y. Yamamoto and R. Bassi, 1996], über die Veränderung in der Verteilung der einzelnen Carotinoide zueinander, die an den beiden Photosystemen (I & II) gebunden sind, auf eine strukturelle Veränderung im Photosyntheseapparat geschlossen werden.

Um zu überprüfen, ob die Anzucht der beiden Tabakpflanzen JWB und Su/su unter einer erhöhten *CO₂*-Atmosphäre (700 ppm) eine Veränderung in der Verteilung der einzelnen Carotinoide bewirkt, wurde die HPLC-Technik eingesetzt.

Als Ausgangsmaterial für die Carotinoidisolierung diente der Gesamtlipidextrakt aus den Thylakoidmembranen der beiden Tabakpflanzen und ihrer jeweiligen *CO₂-Pflanzen*. Das Alter der Pflanzen, aus denen die Thylakoidmembranen isoliert wurden, lag bei dem Wildtyp JWB bei 28 Tagen und bei der chlorophyllarmen Mutante Su/su bei 35 Tagen. Die Carotinoide lassen sich nach der Verseifung der etherlöslichen Lipide (Gesamtlipidextrakt) mit 0,5 n methanolische NaOH von den Salzen der Fettsäuren gut trennen.

Die folgende Tabelle gibt die Verteilung der Carotinoide und Chlorophylle in Prozent bezogen auf 100 % Gesamtlipidextrakt der Thylakoidmembranen der beiden Tabakpflanzen

JWB & Su/su und ihrer CO_2 -Pflanzen wieder. Der Chlorophyll a & b Anteil im Gesamtlipidextrakt wurde nach der Methode von G.H. Schmid [1971] bestimmt.

Tabelle 3.8 Prozentuale Verteilung der Chlorophylle und Carotinoide bezogen auf 100 % Gesamtlipide, isoliert aus den Thylakoidmembranen der Tabakpflanzen N.t.var. JWB und Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO_2 -Konzentration (700 ppm).

Konzentrationen [%]	JWB-Gesamtlipidextrakt der Thylakoidmembranen		Su/su-Gesamtlipidextrakt der Thylakoidmembranen	
	350 ppm CO_2	700 ppm CO_2	350 ppm CO_2	700 ppm CO_2
Chlorophyll a	17,95	17,15	10,13	8,74
Chlorophyll b	7,95	7,85	3,1	2,49
Neoxanthin	0,1	0,11	0,049	0,055
Violaxanthin	0,11	0,13	0,098	0,086
Lutein	1,89	1,93	0,5	0,57
β -Carotin	0,51	0,63	0,43	0,38

Tabelle 3.9 Verhältnisse von β -Carotin/Lutein- (w/w) und von β -Carotin/Xanthophyll- (w/w) der Lipidextrakte, isoliert aus den Thylakoidmembranen der Tabakpflanzen JWB und Su/su, angezogen unter natürlicher (350 ppm) und erhöhter CO_2 -Konzentration (700 ppm).

	JWB-Gesamtlipidextrakt Thylakoidmembranen		Su/su-Gesamtlipidextrakt Thylakoidmembranen	
	350 ppm CO_2	700 ppm CO_2	350 ppm CO_2	700 ppm CO_2
β -Carotin / Lutein	0,27	0,33	0,86	0,67
β -Carotin / Xanthophyll	0,24	0,29	0,66	0,53

Der Vergleich der Carotinoid-Verhältnisse im Gesamtlipidextrakt isolierter Thylakoidmembranen der beiden Tabakpflanzen JWB und Su/su und ihrer jeweiligen *CO*₂-Pflanzen in Tabelle 3.9 zeigt:

Beim Wildtyp JWB steigen die Verhältnisse β -Carotin/Lutein (w/w) und β -Carotin/Xanthophyll (w/w) im Gesamtlipidextrakt isolierter Thylakoidmembranen der *CO*₂-Pflanzen um 20 % an.

Bei der chlorophyllarmen Mutante Su/su fallen die Verhältnisse β -Carotin/Lutein (w/w) und β -Carotin/Xanthophyll (w/w) im Gesamtlipidextrakt der *CO*₂-Thylakoidmembranen gegenüber der Kontrollpräparation um über 20 % kleiner aus.

Vergleicht man die Carotinoid-Verhältnisse, die in den Thylakoidmembranen lokalisierten Carotinoide, zwischen dem Wildtyp JWB und der Aureamutante Su/su, so zeigen sich enorme Unterschiede in der Zusammensetzung der Carotinoide.

Im Vergleich zum JWB (Kontrollansatz) fallen die Werte der Verhältnisse β -Carotin/Lutein (w/w) und β -Carotin/Xanthophyll (w/w) im Gesamtlipidextrakt isolierter Thylakoidmembranen der chlorophyllarmen Mutante Su/su (Kontrollansatz) beträchtlich höher aus. Der Grund für diesen Befund liegt in der signifikanten Reduzierung des LHC (I & II) in den Thylakoidmembranen der chlorophyllarmen Mutante Su/su gegenüber dem Wildtyp [Schmid und Gaffron, 1967].

Insofern finden die bisherigen Ergebnisse über die Verteilung und Funktion der Carotinoide im Photosyntheseapparat Höherer Pflanzen [Yamamoto and Bassi, 1996] am Beispiel des Vergleiches der Carotinoidzusammensetzung isolierter Thylakoidmembranen der beiden Tabakpflanzen JWB und Su/su ihre Bestätigung.

Der Vergleich der Carotinoidverteilung im Lipidextrakt isolierter Thylakoidmembranen aus den JWB Kontroll- & *CO*₂-Pflanzen in Tabelle 3.8 zeigt auf, daß der Anteil an β -Carotin im Lipidextrakt der *CO*₂-Thylakoidmembranen deutlich ansteigt. Der prozentuale Gehalt an Lutein bleibt im Gesamtlipidextrakt der *CO*₂-Thylakoidmembranen unverändert. Das Verhältnis β -Carotin/Lutein, als auch das β -Carotin/Xanthophyll-Verhältnis steigt im Lipidextrakt der *CO*₂-Thylakoidmembranen (siehe Tabelle 3.9) gegenüber der Kontrollpräparation deutlich an.

Daraus kann indirekt geschlossen werden, daß bei der Tabakpflanze JWB der Anteil der photosynthetischen Reaktionszentren I und II in den Thylakoidmembranen der *CO*₂-Chloroplasten gegenüber den entsprechenden Kontrollpräparationen deutlich ansteigt.

Der Anteil der Xanthophylle Neoxanthin und Violaxanthin bleibt im Lipidextrakt der *CO*₂-Thylakoidmembranen gegenüber der Kontrollpräparation konstant (siehe Tabelle 3.8).

Die Anzucht der Tabakpflanze JWB unter einem erhöhtem *CO*₂ (700 ppm) hat keinen Einfluß auf den Gehalt an Xanthophyllen in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten. Es scheint also keine Reduzierung des LHC (I & II) in den Thylakoid-

membranen der *CO₂-Pflanzen* eingetreten zu sein. Zu dieser Aussage muß jedoch der kritische Einwand gebracht werden, daß möglicherweise ein Verlust an Pigmenten bei der Isolierung der Lipide aus den Thylakoidmembranen der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su und ihrer *CO₂-Pflanzen* eingetreten ist (dieser Einwand wird im Text weiter unten dargelegt). Daher ist es sicherlich sinnvoller die Veränderung der Verhältnisse der einzelnen Carotinoide untereinander zu diskutieren.

Bei der chlorophyllarmen Mutante Su/su fallen die Verhältnisse β -Carotin/Lutein und β -Carotin/Xanthophyll im Lipidextrakt der *CO₂-Thylakoidmembranen* gegenüber der Kontrollpräparation deutlich ab.

Dies signalisiert eine deutliche Zunahme an LHC in den Thylakoidmembranen der Su/su *CO₂-Pflanzen* und entspricht einer deutlichen Erniedrigung des Chlorophyll a/b Verhältnisses isolierter Thylakoide aus den *CO₂-Pflanzen* gegenüber den entsprechenden Kontrollpräparationen (siehe Tabelle 3.3 auf Seite 68).

Wie schon weiter oben erwähnt, ist möglicherweise ein Teil der Pigmente (Chlorophylle & Carotinoide) bei der Isolierung der Lipide mit organischen Lösungsmitteln aus den Thylakoidmembranen der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su und ihrer *CO₂-Pflanzen* zerstört worden. Denn bei der nachträglichen Bestimmung des Chlorophyllgehaltes in den Lipidextrakten fällt der Anteil an Chlorophyll in Prozent bezogen auf 100 % Gesamtlipide bei allen Lipidextraktionen deutlich ab. Da aber für die Lipidextraktion definierte Mengen an Thylakoidmembranen der beiden Tabakpflanzen und ihrer *CO₂-Pflanzen* bezogen auf den absoluten Chlorophyllgehalt herangezogen wurden, müßte der Anteil an Chlorophyll am Trockengewicht der extrahierten Lipide höher ausfallen. Die folgende Tabelle 3.10 gibt die korrigierten Werte wieder.

Tabelle 3.10 Korrigierte %-Angaben der Chlorophyll- & Carotinoidanteile bezogen auf 100 % Gesamtlipide, isoliert aus den Thylakoidmembranen der Tabakpflanzen JWB und Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm).

Konzentrationen [%]	JWB-Gesamtlipidextrakt der Thylakoidmembranen		Su/su-Gesamtlipidextrakt der Thylakoidmembranen	
	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂
Chlorophyll a	23,8	22,5	13,5	13,8
Chlorophyll b	10,5	10,3	4,1	5,6
Chlorophyll a + b	34,2	32,8	17,6	19,4
Carotinoid	7,4	7,21	3,9	4,5

Nach Tabelle 3.10 liegt der prozentuale Anteil an Chlorophyll a und b im Gesamtlipidextrakt der isolierten Thylakoidmembranen aus den Kontroll- & CO₂-Pflanzen der Tabakpflanze JWB bei 34 %. Bei der Aureamutante Su/su liegt der Anteil am Gesamtchlorophyll im Gesamtlipidextrakt bei der Kontrollpräparation bei 17,6 % und bei der CO₂-Präparation bei 19,4 %.

Die Anzucht der beiden Tabakpflanzen JWB und Su/su unter einer erhöhten CO₂-Atmosphäre (700 ppm) führt zu keiner signifikanten Veränderung im Chlorophyllgehalt bezogen auf 100 % Lipide isolierter Thylakoidmembranen. Die Carotinoidwerte in der Tabelle 3.10 wurden über die allgemeine Carotinoidabsorption bei 430 nm abzüglich der Chlorophyllabsorption der intakten Thylakoidmembranen bestimmt.

3.5.3 Bestimmung der Plastochinon-Konzentration im Gesamtlipidextrakt isolierter Thylakoidmembranen.

Plastochinon gehört zu der Gruppe der Polyprenylchinone [Richter, 1988]. Die 9 Isopren-Reste der Seitenkette, die am Benzochinonring des Plastochinonmoleküls gebunden sind, befähigen das Plastochinon als beweglicher Redoxkatalysator in der Lipidphase der Thylakoidmembran zu agieren. Es tritt als beweglicher Redoxkatalysator am Photosystem II auf. Im sogenannten *Z-Schema der Photosynthese* stellt der Plastochinonpool den gesamten beweglichen Teil des Plastochinons in der Thylakoidmembran dar. Als beweglicher Elektronenträger verbindet der Plastochinonpool PS II mit dem Cytochrom b₆/f-Komplex der photosynthetischen Elektronentransportkette. Der Plastochinonpool übernimmt die Elektronen von Q_b, einem am Reaktionszentrum des PS II reversibel gebundenen Plastochinon-

molekül. Q_b seinerseits wird von einem am Reaktionszentrum (D1/D2 Heterodimer) des PS II-Komplex gebundenen, modifizierten Plastochinon, auch „primäres Plastochinon“ (Q_a) genannt, reduziert. Die Elektronenübertragung von Q_a nach Q_b ist mit der Bindung von Protonen (H^+ -Ionen) gekoppelt [Richter, 1988]. Plastochinon wird zu Plastohydrochinon reduziert. Zur vollständigen Reduktion des Plastochinon werden 2 Elektronen und 2 Protonen benötigt. Die Bindungsstelle für das Q_b am Reaktionszentrum von PS II ist am D1 Protein lokalisiert. Erst die vollständige Reduktion des Plastochinon zu Plastohydrochinon an der Q_b -Bindungsstelle am D1-Protein des PS II führt zur Freisetzung des Plastohydrochinons an der Q_b -Bindungsstelle des PS II.

Einige Autoren sind der Meinung, daß neben der Q_b -Bindungsstelle möglicherweise auch eine PQ-Bindungsstelle (Plastochinon-Bindungsstelle) am Photosystem II existiert [Y. Kashino et al., 1996; Satoh et al., 1995]. Satoh [Satoh et al., 1993] stellte die Hypothese auf, daß das Plastochinonmolekül an der Q_b -Bindungsstelle nach Reduktion sich nicht von der Q_b -Bindungsstelle löst. Nur der Kopf des Plastochinonmoleküls ginge nach der Reduktion aus der „ Q_b -Bindungstasche“ heraus und gäbe die Elektronen und Protonen an ein freies Plastochinonmolekül weiter. Anschließend wandere der „Kopf des Plastochinonmoleküls“, welches an der Q_b -Bindungsstelle gebunden ist, wieder in die „ Q_b -Tasche“.

Frühere Untersuchungen zeigen auf, daß der Gehalt an Plastochinon im Plastochinonpool der Thylakoidmembranen mit zunehmendem Alter der Pflanzen oder bei Erhöhung der Lichtintensität zunimmt [H.K. Lichtentaler, 1969]. So fanden Lichtentaler und Pfister [1978] in Sonnenblättern von *Fagus sylvatica* bis zu 7 mal mehr Plastochinon als in Schattenblättern der selben Pflanze. Die Größe des Plastochinonpools ist also nicht festgelegt. Ihre Größe ist von äußeren (Umwelt) und inneren Faktoren (physiologischer Zustand der Pflanze) abhängig.

Die Frage stellt sich, ob die Anzucht der beiden Tabakpflanzen JWB und Su/su in einer erhöhten CO_2 -Atmosphäre (700 ppm) zu einer signifikanten Veränderung der Plastochinonpoolgröße in den Thylakoidmembranen führt.

Als Ausgangsmaterial zur Bestimmung der Plastochinonkonzentration in den Thylakoidmembranen der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su und ihrer CO_2 -Pflanzen dient der Gesamtlipidextrakt der isolierten Thylakoidmembranen. Die quantitative Plastochinon Bestimmung (HPLC-Analyse) wurde nach der Methode von Hundal et al. [1985] durchgeführt.

Die folgende Tabelle gibt die Ergebnisse der quantitativen Plastochinonbestimmung im Gesamtlipidextrakt isolierter Thylakoidmembranen beider Tabakpflanzen und ihrer CO_2 -Pflanzen wieder.

Tabelle 3.11 Quantitative Bestimmung des Plastochinonpool im Gesamtlipidextrakt isolierter Thylakoidmembranen der Tabakpflanzen JWB und Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm).

	JWB-Gesamtlipidextrakt der Thylakoidmembranen		Su/su-Gesamtlipidextrakt der Thylakoidmembranen	
	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂
Plastochinon-Anteil % Gesamtlipid	0,564	0,939	0,948	0,903
Plastochinon-Anteil % Chlorophyllmenge	1,64	2,84	5,37	4,65

Beim Wildtyp JWB steigt der prozentuale Anteil an Plastochinon im Gesamtlipidextrakt isolierter Thylakoidmembranen der *CO₂-Pflanzen* gegenüber den Kontrollen sehr stark an. Die Zunahme von 0,564 % auf 0,939 % im Gesamtlipid entspricht einer prozentualen Steigerung von 66 %. Bezogen auf Chlorophyll (a & b) steigt der prozentuale Anteil an Plastochinon von 1,64 % bei den Kontroll-Thylakoidmembranen auf 2,84 % bei den *CO₂-Thylakoidmembranen* also nahezu auf das Doppelte an. Dies entspricht einer prozentualen Steigerung des Plastochinonanteils von über 70 %.

Die Anzucht des Wildtyps JWB in einer erhöhten CO₂-Atmosphäre (700 ppm) führt nach 28 Tagen zu einem sehr starkem Anstieg der Plastochinonmenge in den Thylakoidmembranen der *CO₂-Pflanzen* bezogen auf Gesamtlipid als auch auf Chlorophyll. Hier sei noch einmal erwähnt, daß die Lichtintensität nicht verändert wurde.

Der Anstieg an Plastochinon im Gesamtlipidextrakt der *CO₂-Pflanzen* gegenüber der Kontrollpräparation ist klar ein *CO₂-Effekt*.

Bei der chlorophyllarmen Mutante Su/su verändert das Wachstum der Pflanzen unter 700 ppm CO₂ den Plastochinonanteil am Gesamtlipidextrakt isolierter Thylakoidmembranen nur geringfügig. Bezogen auf 100 % Gesamtlipide isolierter Thylakoidmembranen fällt der prozentuale Anteil an Plastochinon von 0,948 % bei den Kontroll-Thylakoidmembranen auf 0,903 % bei den *CO₂-Thylakoidmembranen* ab. Dies entspricht einer prozentualen Abnahme des Plastochinon am Gesamtlipidextrakt von nur - 4,7 %. Bezogen auf Chlorophyll fällt der Plastochinonanteil von 5,37 % bei der Kontrollpräparation auf 4,65 % bei den *CO₂-Thylakoidmembranen* ab. In diesem Fall fällt der Plastochinonanteil bezogen auf 100 % Chlorophyll um - 13,4 % ab, was nicht vernachlässigt werden kann.

Die Anzucht der chlorophyllarmen Mutante Su/su in einer erhöhten CO₂-Atmosphäre (700 ppm) führt zu einer Abnahme an Plastochinon im Gesamtlipidextrakt, als auch bezogen auf Chlorophyll in den Thylakoidmembranen der *CO₂-Pflanzen*.

Der Vergleich der prozentualen Anteile an Plastochinon am Gesamtlipidextrakt isolierter Thylakoidmembranen der beiden Tabakpflanzen JWB und Su/su untereinander zeigt erhebliche Unterschiede auf. Liegt der prozentuale Anteil an Plastochinon am Gesamtlipidextrakt isolierter Thylakoidmembranen aus dem Wildtyp JWB bei 0,564 %, so steigt der Plastochinonanteil im Gesamtlipidextrakt isolierter Thylakoidmembranen aus der chlorophyllarmen Mutante auf 0,948 % an. Bezogen auf die Gesamtlipide steigt der Anteil an Plastochinon in den Thylakoidmembranen der Mutante Su/su gegenüber dem Wildtyp JWB um über 65 % an. Bezieht man den Plastochinongehalt auf 100 % Chlorophyll, so wird der Unterschied zwischen den beiden Tabakpflanzen noch gravierender. Bezogen auf Chlorophyll steigt der Anteil an Plastochinon in den Thylakoidmembranen der chlorophyllarmen Mutante Su/su gegenüber dem Wildtyp JWB um über 200 % an. Schmid und Gaffron [1967] untersuchten die Größe des Licht-Sammel-Antennen-Komplexes (LHC) in Tabakpflanzen JWB und der davon abgeleiteten chlorophyllarmen grüngelben Mutante Su/su und der gelbgrünen Mutante Su/su Aurea. Sie wiesen nach, daß in den Thylakoidmembranen der beiden Tabakmutanten Su/su und Su/su Aurea gegenüber dem Wildtyp JWB eine deutliche Reduzierung des LHC eingetreten ist. Daher sind die beiden chlorophyllarmen Mutanten in der Lage unter sehr hohen Lichtintensitäten zu wachsen. Sie benötigen sogar die hohen Lichtintensitäten, um ein gutes Wachstumsverhalten zu zeigen. Unter der gegebenen Lichtintensität von ca. $140 \mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$. in den Klimakammern zeigen die Tabakmutanten ein deutlich schwächeres Wachstumsverhalten als der Wildtyp. Die Mutante Su/su ist also eine an Starklicht angepaßte Pflanzenform.

Frühere Untersuchungen konnten zeigen, daß die Erhöhung der Lichtintensität den Plastochinongehalt in den Thylakoidmembranen ansteigen läßt [Lichtentaler & Pfister, 1978]]. Diese Beobachtung findet man auch im Vergleich des Plastochinongehaltes der Thylakoidmembranen der beiden Tabakpflanzen JWB und Su/su. Die an Starklicht adaptierte chlorophyllarme Mutante Su/su weist gegenüber dem dunkelgrünen Wildtyp JWB einen erheblich größeren Anteil an Plastochinon in den Thylakoidmembranen auf.

Der Anstieg des Plastochinongehaltes in den Thylakoidmembranen der JWB CO_2 -Pflanzen gegenüber der Kontrollanzucht kann demnach als eine biochemische Anpassung an eine hohe Lichtintensität verstanden werden. Die Lichtintensität wurde aber bei der Anzucht nicht erhöht! Die Ergebnisse der Carotinoidverteilung im Gesamtlipidextrakt isolierter Thylakoidmembranen der Kontroll- & CO_2 -Pflanzen signalisieren einen Anstieg der beiden Reaktionszentren (I & II) im Photosyntheseapparat der CO_2 -Pflanzen. Dies kann ebenfalls zu einer Erhöhung des Plastochinongehaltes in den Thylakoidmembranen der CO_2 -Pflanzen führen.

Bei der chlorophyllarmen Mutante Su/su fällt der Plastochinongehalt in den Thylakoidmembranen der CO_2 -Pflanzen bezogen auf die Gesamtlipide geringfügig ab. Bezieht man den Plastochinongehalt auf die in den Thylakoidmembranen gebundenen Chlorophylle, so fällt der Plastochinongehalt in den Thylakoidmembranen der CO_2 -Pflanzen

gegenüber den Kontrollanzuchten deutlicher ab. Das Chlorophyll a/b Verhältnis der eingesetzten Thylakoidmembranen lag bei der Kontrollanzucht bei 4,26 und das der CO_2 -Pflanzen bei 3,4. Die signifikante Erniedrigung des Chlorophyll a/b (w/w) Verhältnis in den Thylakoidmembranen der CO_2 -Pflanzen gegenüber der entsprechenden Kontrollpräparation, signalisiert eine deutliche Zunahme der LHC-Proteine (I & II) im Photosyntheseapparat der CO_2 -Pflanzen. Auch die signifikante Abnahme der Carotinoidverhältnisse β -Carotin/Lutein (w/w) und β -Carotin/Xanthophyll (w/w) im Gesamtlipidextrakt isolierter Thylakoidmembranen der CO_2 -Pflanzen signalisiert eine deutliche Verschiebung des Verhältnis Reaktionszentren/LHC (I & II) in Richtung LHC (I & II). Daher scheint es nicht verwunderlich, wenn in den Thylakoidmembranen der CO_2 -Pflanzen von Su/su der Gehalt an Plastochinon kleiner ausfällt.

3.5.4 Qualitative und quantitative Bestimmung der Fettsäuren isolierter Thylakoidmembranen.

Zahlreiche experimentelle Daten stützen die Vorstellung, wonach im Chloroplasten eine Reihe von Lipiden unterschiedlicher Struktur - in erster Linie Fettsäuren und Isoprenoide - entstehen [Richter, 1996]. Bei der Synthese von Fettsäuren im Chloroplasten spielt möglicherweise das Molekül 3-Phospho-D-glycerat (3-PGS), welches aus der photosynthetischen Kohlenstofffixierung (Calvin-Zyklus) stammt, eine wichtige Rolle. Denn es kann im Chloroplasten zur Bildung von Acetyl-Coenzym A über Pyruvat als Zwischenstufe verwendet werden ($C_3 \rightarrow C_2$ -Weg). Alle für die Einzelschritte erforderlichen Enzyme (Phosphoglycerat-Mutase, Enolase, Pyruvat-Kinasen und Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex) wurden in Chloroplasten von Gerste, Erbse und Spinat gefunden und charakterisiert. Jedoch scheint dieser Biosynthese-Weg zur Synthese von Fettsäuren auf junge, sich entwickelnde Chloroplasten beschränkt zu sein. Dies zeigen Einbauversuche mit ^{14}C -markiertem CO_2 bzw. Acetat. Vollentwickelte Chloroplasten verwenden überwiegend importiertes Acetat anstelle von 3-PGS [Hoppe et al., 1993]. Das Acetat wird über eine energieverbrauchende Reaktion an Coenzym A gebunden. Dabei wird ATP zu AMP und PP_i gespalten. An das Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) werden sukzessiv Acetyl-Reste angefügt. Diese werden in Form von Malonyl-CoA angeboten. Malonyl-CoA entsteht aus der Bindung von Kohlensäure (Carboxybiotin = *aktivierte Kohlensäure*) an Acetyl-CoA unter der Beteiligung der Enzyme Acetyl-CoA-Carboxylase und Transcarboxylase. Dabei wird ATP verbraucht. Die Verknüpfung von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA zu langkettigen Fettsäuren (gesättigt) wird durch die Fettsäure-Synthase bewerkstelligt. Die Fettsäure-Synthase ist ein Multi-Enzymkomplex. Bei der schrittweisen Verlängerung der gesättigten Fettsäuren werden pro C_2 -Einheit zwei Moleküle $NADPH + H^+$ verbraucht. Um die gesättigten Fettsäuren in ungesättigte Fettsäuren umzuwandeln werden bestimmte Enzyme, in der Literatur als Desaturasen bezeichnet, benötigt. Die meisten von ihnen sind integrale Membranproteine. Man geht davon aus, daß die Desaturierung der Fettsäuren erst nach der Fertigstellung der

Lipidgrundstruktur einsetzt, d.h. nachdem die gesättigten Fettsäuren in diese eingebunden sind. Vermutlich wird dabei ebenfalls $\text{NADPH} + \text{H}^+$ verbraucht [Richter, 1996].

In den Chloroplasten findet also nicht nur die Photosynthese statt. Es sind noch eine Reihe von anderen Biosynthesen im Chloroplasten lokalisiert, welche die primären Produkte der Lichtreaktion der Photosynthese nämlich ATP und $\text{NADPH} + \text{H}^+$ benötigen.

Die Zusammensetzung der Fettsäuren in den Biomembranen wird von der Temperatur mitbestimmt. Die Temperatur wiederum wird letztlich von der Lichtintensität beeinflusst, d.h. bei hohen natürlichen Lichtintensitäten (Wüstenregionen) ist die durchschnittliche Tagestemperatur höher. Bei einigen Pflanzen konnte aufgezeigt werden, daß bei niedrigen Temperaturen der Anteil der ungesättigten Fettsäuren in den Membranen zunimmt [Quinn und Williams, 1978]. Dennoch scheint nicht unbedingt ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen der Abnahme der Temperatur und der Zunahme der ungesättigten Fettsäuren in den Membranen Höherer Pflanzen zu existieren [Hawker, 1982].

In den Blattzellen der Höheren Pflanzen dominieren die mehrfach ungesättigten Fettsäuren insbesondere die Linol- und Linolensäure. Diese beiden Fettsäuren können in Blattzellen mehr als 70 % der Gesamtfettsäuren ausmachen [Richter, 1996]. In den Blattlipiden der Tabakpflanze *Nicotiana tabacum* John William's Broadleaf (JWB) dominiert die $\text{C}_{18:3}$ Fettsäure (Linolensäure). Ihr prozentualer Anteil beträgt etwas über 50 %. Mit 15 % Anteil an den Gesamtfettsäuren folgt die Linolsäure ($\text{C}_{18:2}$). Bei den gesättigten Fettsäuren überwiegt die $\text{C}_{16:0}$ Fettsäure (Palmitinsäure). Ihr Anteil liegt bei 13 %. In nennenswerten Mengen kommen noch die Fettsäuren: $\text{C}_{16:1}$ mit 3,2 % Anteil, die $\text{C}_{16:3}$ mit 7,2 % Anteil sowie die Ölsäure ($\text{C}_{18:0}$) mit 2,3 % Anteil an den Gesamtfettsäuren vor [Schmid et al., 1999].

In den Blattlipiden der chlorophyllarmen Tabakpflanze *Nicotiana tabacum* Aurea mutante *Su/su* fällt die Verteilung der Fettsäuren ähnlich wie bei dem Wildtyp JWB aus [Schmid et al., 1999].

Im Rahmen dieser Arbeit stellt sich nun die Frage, ob das Wachstum der beiden Tabakpflanzen JWB & *Su/su* unter einer erhöhten CO_2 -Atmosphäre (700 ppm) die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Fettsäuren in den isolierten Thylakoidmembranen verändert. Denn dies kann dann seinerseits einen Einfluß auf die Photosynthese haben. Die Analyse der Verteilung der Fettsäuren wurde mit Hilfe der Gaschromatographie durchgeführt.

Tabelle 3.12 Qualitative und quantitative Bestimmung der Fettsäuren isolierter Thylakoidmembranen der beiden Tabakpflanzen JWB und Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm).

Fettsäuren	JWB Thylakoidmembranen		Su/su Thylakoidmembranen	
	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂
C ₁₀ : 0	2,91 ± 1,6	2,63 ± 0,14	2,54 ± 0,15	0,4 ± 0,02
C ₁₂ : 0	0,37 ± 0,03	0,24 ± 0,017	0,5 ± 0,06	0,26 ± 0,04
C ₁₂ : 1	0,1 ± 0,01	0,05		
C ₁₂ : 2				
C ₁₂ : 3	0,67 ± 0,05	0,67 ± 0,09	0,11 ± 0,06	
C ₁₄ : 0	0,29 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,48 ± 0,07	0,3 ± 0,03
C ₁₄ : 1			0,12 ± 0,01	0,07 ± 0,005
C ₁₄ : 2	0,1 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,37 ± 0,05	0,1 ± 0,01
C ₁₄ : 3	0,14 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,23 ± 0,05	0,17 ± 0,04
C ₁₆ : 0	6,29 ± 0,16	6,17 ± 0,11	14,49 ± 1,81	14,52 ± 1,68
C ₁₆ : 1	2,28 ± 0,015	1,92 ± 0,13	2,24 ± 0,02	1,79 ± 0,13
C ₁₆ : 2	1,6 ± 0,02	1,5 ± 0,015	0,85 ± 0,03	0,54 ± 0,1
C ₁₆ : 3	13,95 ± 0,06	11,44 ± 0,08	10,45 ± 0,45	7,3 ± 0,09
C ₁₈ : 0	0,93 ± 0,04	0,95 ± 0,17	1,47 ± 0,23	2,08 ± 0,18
C ₁₈ : 1	1 ± 0,01	0,96 ± 0,07	2,03 ± 0,31	2,05 ± 0,34
C ₁₈ : 2	5,65 ± 0,05	5,88 ± 0,07	7,77 ± 0,29	5,91 ± 0,12
C ₁₈ : 3	63,8 ± 0,05	67,18 ± 0,22	56,32 ± 2,87	65,55 ± 2,61

Die Anzucht der Tabakpflanze JWB unter eine erhöhte CO₂-Atmosphäre (700 ppm) führt zu leichten Veränderung in der Verteilung der Fettsäuren. Die grau gefärbten Zeilen zeigen die Fettsäuren der isolierten CO₂-Thylakoidmembranen, bei denen sich deutliche Unterschiede gegenüber dem Fettsäuregemisch der Kontroll-Thylakoidmembranen zeigen. So fällt der prozentuale Anteil der C₁₆:1 Fettsäure im Fettsäuregemisch der CO₂-Thylakoidmembranen gegenüber der Kontrollpräparation kleiner aus (- 15,9 %). Auch die C₁₆:3 Fettsäure nimmt in den Thylakoidmembranen der CO₂-Pflanzen gegenüber den Kontrollpflanzen ab (- 18 %). Der Anteil der Linolensäure (C₁₈:3) steigt im Fettsäuregemisch der isolierten Thylakoidmembranen der CO₂-Pflanzen leicht an. Die Linolensäure macht über 60 % der Gesamtfettsäuren in den Membranlipiden der Thylakoide aus.

Vergleicht man das Verhältnis gesättigte Fettsäuren zu ungesättigten Fettsäuren (C:0 / (C:1+C:2+C:3)) zwischen dem Fettsäuregemisch der JWB Kontroll- & CO₂-Thylakoidmembranen so nimmt das Verhältnis bei den CO₂-Pflanzen leicht ab (- 5,8 %). Das heißt, daß der Anteil der ungesättigten Fettsäuren etwas zunimmt. Jedoch zeigt sich innerhalb der ungesättigten Fettsäuren eine größere Veränderung zwischen den Kontroll- & CO₂-Thylakoidmembranen. Das Verhältnis einfach ungesättigter- zu mehrfach ungesättigten

Fettsäuren (C:1 / (C:2+C:3)) fällt im Fettsäuregemisch der isolierten *CO₂-Thylakoidmembranen* um 15,4 % kleiner aus. Es tritt also innerhalb der ungesättigten Fettsäuren eine Verschiebung von einfach ungesättigten zu mehrfach ungesättigten Fettsäuren auf. Dies kann einen Effekt auf die Fluidität der Thylakoidmembranen in den JWB *CO₂-Pflanzen* haben. D.h., sie kann in den Thylakoidmembranen der *CO₂-Chloroplasten* zugenommen haben. Auf der Ebene der Thylakoidmembranen hat das Wachstum der Tabakpflanze JWB unter erhöhtem CO_2 aber letztlich keinen großen Einfluß auf die Zusammensetzung der Fettsäuren. Schmid et al. [1999] untersuchten die Fettsäurezusammensetzung der gesamten Blattlipide der beiden Tabakpflanzen JWB und Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO_2 -Konzentration (700 ppm). Bei dem Tabakwildtyp JWB steigt der Anteil der gesättigten Fettsäuren bei Anzucht unter erhöhtem CO_2 (700 ppm) um über 50 % an, während der Anteil der ungesättigten Fettsäuren um 10 % abfällt (die ungesättigten Fettsäuren machen aber über 80 % der Blattlipide aus). Das Verhältnis der gesättigten Fettsäuren zu ungesättigten Fettsäuren steigt also im Fettsäuregemisch der Blattlipide aus den *CO₂-Pflanzen* um über 40 % an. Auf der Ebene der gesamten Blattlipide kommt es zu einer deutlichen Zunahme der gesättigten Fettsäuren. **Dies entspräche einer Anpassung an höhere Temperaturen.** Auf der Ebene der Thylakoidmembranlipide tritt eine solche Anpassung nicht ein. Demnach findet die Zunahme der gesättigten Fettsäuren in den Blättern der *CO₂-Pflanzen* in anderen Zellmembranen statt.

Bei der Tabakmutante Su/su zeigen sich größere Unterschiede in der Verteilung der Fettsäuren zwischen den isolierten Thylakoidmembranen der Kontroll- & CO_2 -Pflanzen. So nimmt die $C_{10:0}$ Fettsäure im Fettsäuregemisch der *CO₂-Thylakoidmembranen* um – 84 % ab. Die Fettsäuren $C_{16:1}$, $C_{16:3}$ und die $C_{18:2}$ nehmen im Fettsäuregemisch der isolierten Thylakoidmembranen der *CO₂-Pflanzen* deutlich (- 20 %, - 30 % und - 17 %) ab. Dagegen steigt der Anteil der $C_{18:3}$ Fettsäure (Linolensäure) an den Gesamtfettsäuren in den *CO₂-Thylakoidmembranen* gegenüber der Kontrollpräparation von 56,3 % auf 65,5 % an. Dies entspricht einer prozentualen Steigerung von 16,4 %. Vergleicht man das Verhältnis der gesättigten- zu ungesättigten Fettsäuren (C:0 / (C:1+C:2+C:3)) zwischen den Gesamtfettsäuregemischen der Kontroll- & CO_2 -Thylakoidmembranen, so fällt das Verhältnis im Fettsäuregemisch der *CO₂-Thylakoidmembranen* um 12,5 % kleiner aus. Das heißt, der Anteil der gesättigten Fettsäuren nimmt im Fettsäuregemisch der *CO₂-Thylakoidmembranen* ab. Dagegen steigt der Anteil der ungesättigten Fettsäuren an. Das Verhältnis einfach ungesättigter- zu mehrfach ungesättigter Fettsäuren (C:1 / (C:2+C:3)) fällt im Fettsäuregemisch der *CO₂-Thylakoidmembranen* gegenüber der Kontrollpräparation um 15,5 % kleiner aus. Wie bei dem Wildtyp JWB verschiebt die Anzucht der Tabakmutante Su/su unter einer erhöhten CO_2 -Atmosphäre (700 ppm) das Verhältnis einfach ungesättigten- zu mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Richtung der mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Dies resultiert aus der Zunahme der dreifach ungesättigten Fettsäuren (insbesondere die der Linolensäure), während der Anteil der zweifach ungesättigten Fettsäuren im Fettsäuregemisch der *CO₂-Thylakoidmembranen* sogar abnimmt.

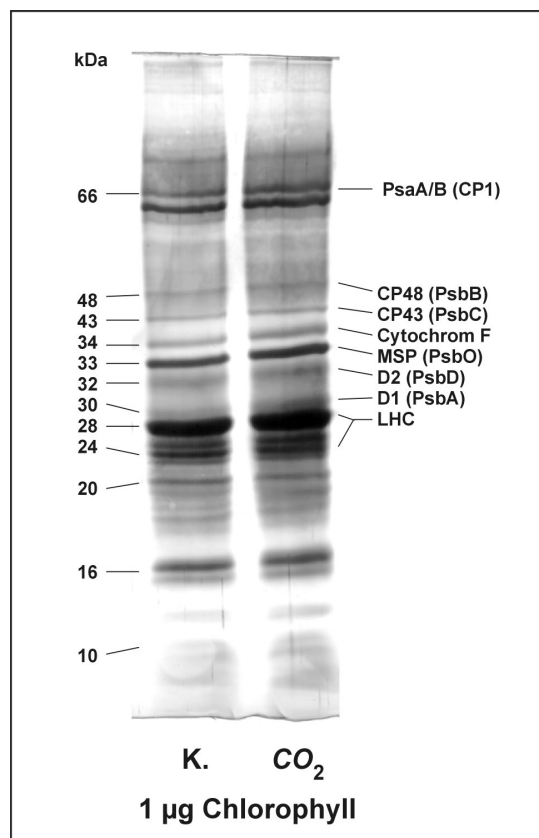
Die Veränderung in der Verteilung der Fettsäuren im Fettsäurengemisch kann sicherlich zu einer Erhöhung der Fluidität der Thylakoidmembranen in den Chloroplasten der Su/su CO₂-Pflanzen beitragen.

Auf der Ebene der gesamten Blattlipide fällt das Verhältnis der gesättigten Fettsäuren zu ungesättigten Fettsäuren bei Anzucht unter einem erhöhtem CO₂-Partialdruck (700ppm) um 16 % ab [Schmid et al., 1999]. Bei der Tabakmutante Su/su findet man diesen Trend auch bei den Fettsäuren der Thylakoidmembranlipide.

3.6 Analyse der Polypeptidzusammensetzung isolierter Thylakoidmembranen und PS I-Komplexe mit der Natriumdodecylsulfat-(SDS) Gelelektrophorese.

Zunächst werden die Ergebnisse der Analyse der Polypeptidzusammensetzung von isolierten Thylakoidmembranen und PS I-Komplexe) des Tabakwildtyps JWB und anschließend der Tabakmutante Su/su beschrieben. Die SDS-Gele wurden mit 0,1% Silbernitrat angefärbt. Die Probenkonzentration der verschiedenen Präparationen der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su wurde auf Chlorophyll bezogen.

Abbildung 3.15 Polypeptidzusammensetzung isolierter Thylakoidmembranen der Tabakpflanze N.t.var. JWB, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO_2 -Konzentration (700 ppm).



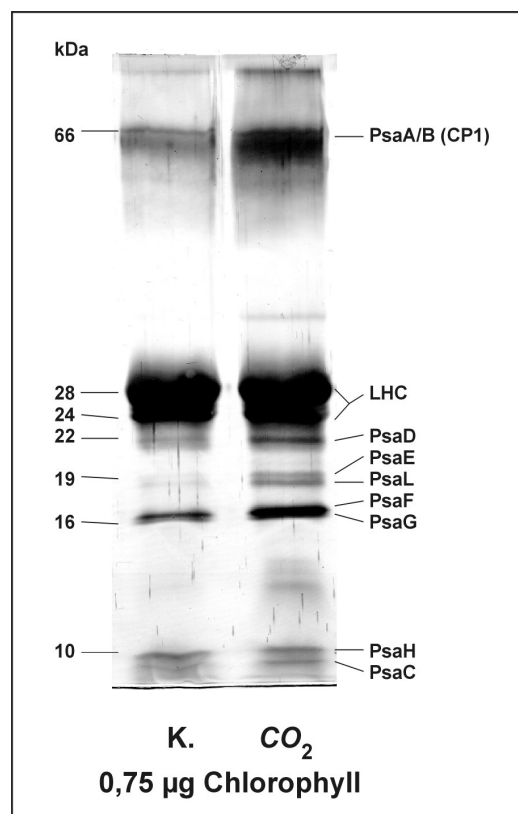
Alter der Pflanzen: 28 Tage

Die Abbildung 3.15 zeigt die Polypeptidzusammensetzung isolierter Thylakoidmembranen der Kontroll- & CO_2 -Pflanzen. Auf dem ersten Blick scheint keine Veränderung in der Verteilung der Polypeptide der CO_2 -Thylakoidmembranen gegenüber der Kontrollpräparation eingetreten zu sein. Das heißt, die Anzucht der Tabakpflanze JWB unter einer erhöhten CO_2 -Konzentration führt zu keiner qualitativen Veränderung der Polypeptidzusammensetzung der isolierten CO_2 -Thylakoidmembranen. Es kommen in den SDS-Gelen der Thylakoidmembranen der Kontroll- & CO_2 -Pflanzen alle Banden (Polypeptide) vor. Die Unterschiede in dem Bandenmuster der aufgetrennten Polypeptide der Thylakoidmembranen sind quantitativer Art. Denn bei genaueren Betrachtung der SDS-Gele sieht man, dass die Proteinbanden im 66 kDa Bereich, wo die beiden Polypeptide des Reaktionszentrums von PS I (Chlorophyll Protein 1 (CP1), auch nach den Genen PsaA/B genannt) liegen, im SDS-Gel der CO_2 -Thylakoidmembranen gegenüber den Kontrollen stärker angefärbt sind. Auch im Bereich der Chlorophyll-Proteine mit den apparenten Molekülmassen (MW) von 47 kDa (CP47, PsbB) & 43 kDa (CP43, PsbC) zeigt das SDS-Gel der Thylakoidmembranen aus den CO_2 -Pflanzen eine deutlich stärkere Färbung dieser Polypeptide. So werden auch die Polypeptide des Reaktionszentrum von PS II, D1 (PsbA) und D2 (PsbD) genannt, die im SDS-Gel um 30/31 kDa (D1) und um 32 kDa (D2) liegen, im SDS-Gel der CO_2 -

Thylakoidmembranen ebenfalls deutlich stärker mit Silbernitrat angefärbt. Auch die Polypeptide mit den apparenten Molekularmassen von 33 kDa und 34 kDa, die dem MSP (Manganese stabilizing protein, PsbO) und dem Cytochrom f des Cytochrom *b₆/f*-Komplexes zugeordnet sind, zeigen im SDS-Gel der *CO₂-Thylakoidmembranen* eine deutlich stärkere Markierung mit Silbernitrat. Einige kleinere Proteine mit apparenten Molekularmassen unterhalb von 20 kDa scheinen im SDS-Gel der *CO₂-Thylakoidmembranen* ebenfalls etwas stärker angefärbt zu sein. Die Polypeptide des LHC (I & II) werden im SDS-Gel der *CO₂-Thylakoidmembranen* gegenüber der Kontrolle in etwa gleich stark mit Silbernitrat angefärbt. Dies bedeutet, dass in den Thylakoidmembranen der *CO₂-Pflanzen* von JWB keine Reduzierung des LHC (I & II) eingetreten ist. Dieser Befund passt sehr gut zu dem Ergebnis der Analyse der Chlorophyll a- & b Verteilung der isolierten Thylakoidmembranen aus den Kontroll- & *CO₂-Pflanzen* (siehe Tabelle 3.3 auf Seite 68). Das Chlorophyll a/b Verhältnis der isolierten Thylakoidmembranen erfährt bei Anzucht unter 700 ppm *CO₂* keine Veränderung.

Das Wachstum des Tabakwildtyps JWB unter einer erhöhten *CO₂*-Atmosphäre (700 ppm) bewirkt eine strukturelle Veränderung im Photosyntheseapparat. Die Erhöhung der *CO₂*-Konzentration in der Versuchsatmosphäre führt zu einem Anstieg der Polypeptide, welche die beiden Core-Komplexe von Photosystem I & II bilden sowie der Polypeptide, die zur proximalen Lichtantenne gehören

Abbildung 3.16 Polypeptidzusammensetzung isolierter PS I-Komplexe von *Nicotiana tabacum* var. JWB, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter *CO₂*-Konzentration.



Alter der Pflanzen: 26 Tage

Die Abbildung 3.16 zeigt die Polypeptidverteilung nativer PS I-Komplexe (in der Definition von Mullet, 1980) aus den Kontroll- & CO₂-Pflanzen von JWB. Es zeigen sich beträchtliche Unterschiede in der Quantität der Markierung der verschiedenen Polypeptide von Photosystem I. Besonders groß ist der Unterschied in der Markierung des Reaktionszentrums von PS I (CP1, PsaA/B). In diesem Bereich (um 66 kDa) fällt die Markierung im SDS-Gel der isolierten PSI-Komplexe aus den *CO₂-Pflanzen* gegenüber der Kontrolle sehr viel stärker aus. Dies bedeutet, dass der Anteil der Reaktionszentren in den isolierten PS I-Komplexen der *CO₂-Pflanzen* gegenüber den Kontroll PS I-Komplexen erheblich zugenommen hat. Die Zunahme an Reaktionszentren (CP1, PsaA/B) in den nativen PS I-Komplexen der *CO₂-Pflanzen* führt dazu, dass auch die kleineren Polypeptide unterhalb des LHC, die Bestandteile des Photosystem I-Core-Komplexes sind, ebenfalls stark zunehmen. So wird auch die Untereinheit PsaC im SDS-Gel der *CO₂ PS I-Komplexe* deutlich stärker mit Silbernitrat angefärbt. Sie bindet über ihre Cysteinreste die beiden [4Fe-4S] Cluster und stellt so innerhalb des Photosystem I den Elektronentransport von A₁ (Vitamin K1) zum Ferredoxin her, wobei es die Elektronenakzeptoren A₃ und A₄ (die oben genannten beiden [4Fe-4S] Cluster) gebunden hat [Wynn & Malkin, 1988; Goldbeck et al, 1988]. Die Abbildung 3.8 auf Seite 73 zeigt ein Model von Photosystem I. Eine Zunahme des Reaktionszentrums (PsaA/B) muß auch zu einer Zunahme des PsaC Proteins führen, - sollte der Gesamtkomplex funktionstüchtig sein.

Im Bereich des LHC (um 24 bis 28 kDa) wird das SDS-Gel der *CO₂ PS I-Komplexe* gegenüber der Kontrolle etwas stärker mit Silbernitrat angefärbt. **Dies heißt, dass der LHC am PS I-Komplex der *CO₂-Pflanzen* nicht abgenommen hat.** Dies paßt sehr gut zu dem Befund, dass das Chlorophyll a/b Verhältnis der isolierten nativen PS I-Komplexe aus den *CO₂-Pflanzen* gegenüber den Kontrollanzuchten keine Unterschiede aufweist (siehe Tabelle 3.5, Seite 74).

Als Konsequenz der Anzucht unter 700 ppm CO₂ erfährt der Photosyntheseapparat im Bereich von Photosystem I eine strukturelle Veränderung. Der Anteil der PS I-Core-Polypeptide steigt im nativem PS I-Komplex der *CO₂-Pflanzen* stark an.

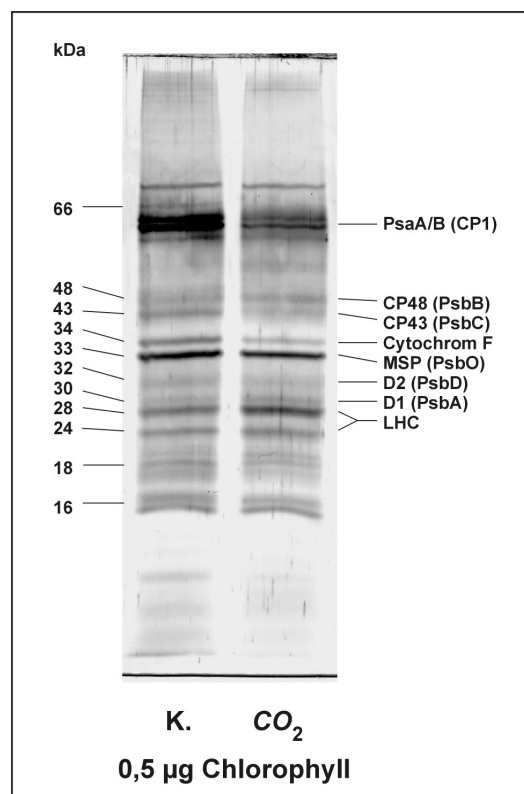
Die Anzucht der Tabakpflanze JWB unter erhöhtem CO₂ (700 ppm) führt gegenüber der Kontrollanzucht zu einer Veränderung in der quantitativen Polypeptidverteilung in Thylakoidmembranen und PS I-Komplexen. Die Probenmenge für die Auftrennung der Polypeptide der verschiedenen Präparationen in der SDS-Gelelektrophorese ist auf Chlorophyll bezogen. Das Ergebnis der Analyse der Polypeptidzusammensetzung von isolierten Thylakoidmembranen und PS I-Komplexen läßt sich damit wie folgt zusammenfassen:

das Wachstum der Tabakpflanze JWB unter einer erhöhten CO₂-Atmosphäre führt zu einem Anstieg der Core-Polypeptide im Photosyntheseapparat. Der Anteil der LHC (I & II)-Polypeptide bleibt dabei praktisch konstant.

Wenn also der Gehalt an LHC (I & II) in den Thylakoidmembranen der *CO₂-Pflanzen* gegenüber Kontrollanzuchten nicht reduziert ist, und dennoch die Konzentration an PS I-Reaktionszentren (CP1, PsaA/B), an denen nur Chlorophyll a gebunden ist, als auch der

Gehalt an CP48 & CP43 (beide bilden die innere Lichtantenne des PS II), an denen ebenfalls nur Chlorophyll a gebunden ist, ansteigt, so muß es demnach in den CO_2 -Thylakoidmembranen zu einer Veränderung in der Pigmentverteilung gekommen sein. **Dies bedeutet, dass ein Teil der Chlorophyll-bindenden-Proteine im Photosyntheseapparat der CO_2 -Pflanzen weniger Chlorophyll a gebunden haben muß.** Anhand des Vergleiches der Polypeptidzusammensetzung isolierter PS I-Komplexe aus den Kontroll- & CO_2 -Pflanzen in Abb. 3.16 wird dieser Befund besonders deutlich. Bezogen auf Chlorophyll (a & b) enthalten die PS I-Präparationen aus den CO_2 -Pflanzen deutlich mehr Protein (siehe Tabelle 3.5 auf Seite 74). Der Anteil an Reaktionszentren (CP1, PsaA/B) ist in den CO_2 PS I-Komplexen sehr stark angestiegen (siehe Abbildung 3.16). Andererseits scheint der Anteil an LHC, der am nativen PS I-Komplex gebunden ist, nicht reduziert zu sein. Die Verringerung der Lichtantenne im Bereich von PS I wie Makewicz [1995b] das darstellte, bedeutet also im Prinzip, dass die Menge an CP1 (dem Apoproteinanteil !) in diesem Bereich des Photosyntheseapparates der CO_2 -Pflanzen angestiegen ist. Im PS I-Core-Komplex trägt nur das CP1 (PsaA/B) Chlorophyll a. Am LHC ist neben Chlorophyll a auch b gebunden. Das Chlorophyll a/b Verhältnis der CO_2 PS I-Komplexe entspricht aber dem der Kontrollpräparationen. Der Anstieg der Konzentration an CP1 im CO_2 PS I-Komplex bei unverändertem Gehalt an LHC-Polypeptiden muß also zu einer Verarmung an Chlorophyll a führen. Dies hat sicherlich eine Auswirkung auf den Lichtsammelmechanismus im Photosystem I.

Abbildung 3.17 Polypeptidzusammensetzung isolierter Thylakoidmembranen von *Nicotiana tabacum* Aureamutante Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO_2 -Konzentration (700 ppm).

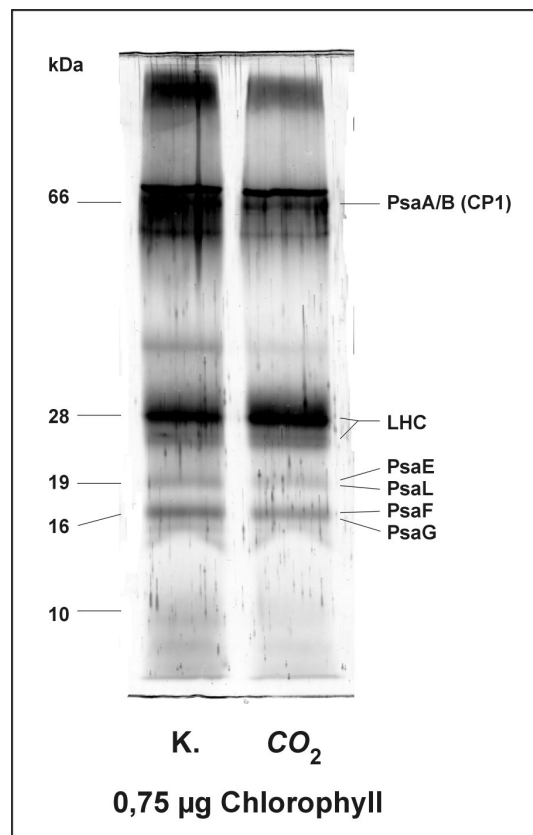


Alter der Pflanzen: 38 Tage

Die Abbildung 3.17 zeigt das SDS-Gel isolierter Thylakoidmembranen aus der Tabakmutante Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm). Es fällt schon auf dem ersten Blick auf, dass die Anzucht der Tabakpflanze Su/su unter erhöhtem CO₂ eine starke Veränderung in der Zusammensetzung der Polypeptide isolierter Thylakoidmembranen bewirkt. Das SDS-Gel der *CO₂-Thylakoidmembranen* wird im Allgemeinen etwas schwächer mit der Silbernitratlösung angefärbt. Dies war zu erwarten gewesen, da das Protein/Chlorophyll Verhältnis der *CO₂-Thylakoidmembranen* im Mittel um 38,7 % gegenüber den Kontrollpräparationen kleiner ausfällt. Besonders auffällig ist die erheblich schwächere Markierung im Bereich des Reaktionszentrums von PS I (CP1, PsaA/B) im SDS-Gel der *CO₂-Thylakoidmembranen*. Die Polypeptide der inneren Lichtantenne von PS II CP 43 (PsbC) und CP 47 (PsbB) werden im SDS-Gel der *CO₂-Thylakoidmembranen* ebenfalls deutlich schwächer angefärbt. Auch im Bereich des Cytochrom f (34 kDa) und des MSP (33 kDa) zeigt das SDS-Gel der *CO₂-Thylakoidmembranen* im Vergleich zur Kontrollpräparation eine erheblich schwächere Färbung mit Silbernitrat. Auf der anderen Seite nimmt die Markierung mit Silbernitrat im Bereich des LHC (I & II) im SDS-Gel der *CO₂-Thylakoidmembranen* beträchtlich zu. Diese Beobachtung, nämlich die stärkere Markierung der LHC-Peptide (I & II) in den *CO₂-Thylakoidmembranen*, stimmt mit der starken Abnahme des Chlorophyll a/b Verhältnisses der *CO₂-Thylakoide* überein (siehe Tabelle 3.3 auf Seite 68).

Die Anzucht der Tabakmutante Su/su unter einer erhöhten CO₂-Konzentration (700 ppm) führt zu einer starken strukturellen Veränderung des gesamten Photosyntheseapparates. Diese Veränderung besteht in einer Reduktion der Core-Komplexe der beiden Photosysteme (I & II) bei gleichzeitigem Anstieg der LHC-Polypeptide im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanzen* von Su/su.

Abbildung 3.18 Polypeptidzusammensetzung isolierter PS I-Komplexe von *Nicotiana tabacum* Aureamutante Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm).



Alter: 38 Tage

Die Polypeptidzusammensetzung isolierter PS I-Komplexe der Kontroll- & CO₂-Pflanzen von Su/su ist in Abbildung 3.18 dargestellt. Im SDS-Gel der Kontroll- & CO₂ PS I-Komplexe sind gravierende Unterschiede in der quantitativen Verteilung der Polypeptide zu erkennen. So fällt bei den CO₂ PS I-Komplexen die Markierung im Bereich des Reaktionszentrums von PS I (CP1, PsaA/B) gegenüber der Kontrollpräparation erheblich schwächer aus. Auch die kleineren zum PS I gehörenden Proteine mit Molekularmassen um 19- und 16 kDa (PsaE, PsaL & PsaF, PsaG) werden im SDS-Gel der CO₂ PS I-Komplexe ebenfalls deutlich schwächer mit Silbernitrat angefärbt. Dagegen steigt der Anteil der LHC-Polypeptide (I & II) in den isolierten PS I-Komplexen der CO₂-Pflanzen gut sichtbar an, wie die Abbildung 3.18 sehr schön zeigt.

Die Anzucht der Tabakmutante Su/su unter einer erhöhten CO₂-Atmosphäre (700 ppm) führt zu einer strukturellen Veränderung im Bereich von Photosystem I (PS I) des Photosyntheseapparates. Diese äußert sich in einer beträchtlichen Abnahme der Reaktionszentren (CP1, PsaA/B) von PS I. Dafür nimmt der Anteil an LHC (I & II) am PS I in den CO₂-Chloroplasten zu. So fällt auch das Chlorophyll a/b Verhältnis der CO₂ PS I-Komplexe gegenüber den Kontrollpräparationen im Mittel um über 45 % kleiner aus (siehe

Tabelle 3.5 auf Seite 74). Dies entspricht den beobachtbaren Veränderungen in der Polypeptidzusammensetzung der isolierten *CO₂ PS I-Komplexe* gegenüber der Kontrollpräparation (siehe Abb. 3.18).

Die Erhöhung der CO₂-Konzentration von 350- auf 700 ppm führt bei der Tabakmutante Su/su zu einer erheblichen strukturellen Veränderung des Photosyntheseapparates. Die Menge der Core-Komplexe der beiden Photosysteme nimmt im Photosyntheseapparat der CO₂-Pflanzen beträchtlich ab, während das Lichtsammelantennensystem (LHC I & II) stark ansteigt.

3.7 Analyse der Verteilung bestimmter Polypeptide des Photosyntheseapparates mit Hilfe des Westernblot-Verfahren.

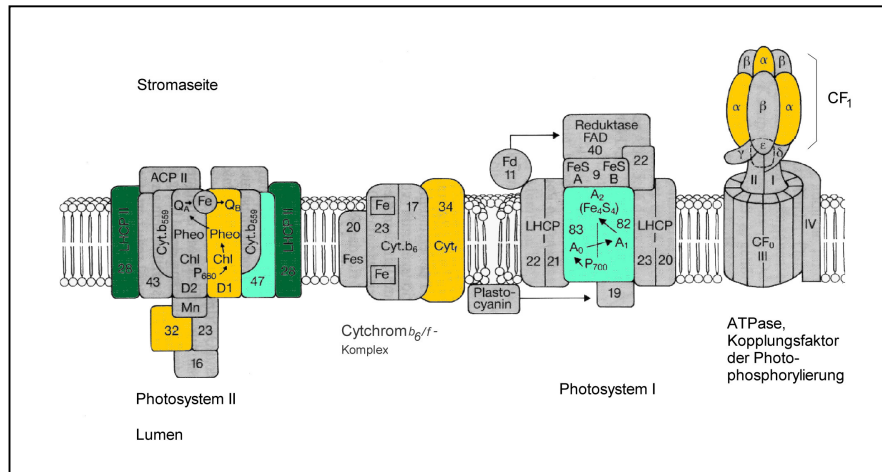
Für die Analyse der Verteilung bestimmter Peptide des Photosyntheseapparates wurden isolierte Thylakoidmembranen der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su und ihrer *CO₂-Pflanzen* herangezogen. Thylakoidmembranen enthalten den gesamten Photosyntheseapparat, der die Lichtreaktionen der Photosynthese betreibt. Die Abbildung 3.19 zeigt ein Modell des Photosyntheseapparates [Schmid, 1993]. Mit Hilfe von monospezifischen Antisera, die gegen Polypeptide des Photosyntheseapparates gerichtet sind, ist es möglich, zu untersuchen, in wieweit sich die Verteilung dieser Proteine in den Thylakoidmembranen der *CO₂-Pflanzen* von JWB & Su/su gegenüber denen der Kontrollpflanzen verändert hat.

Die zur Verfügung stehenden und bei den folgenden Untersuchungen eingesetzten monospezifischen Antisera sind gegen folgende Thylakoidkomponenten gerichtet:

LHC (das 28 kDa Polypeptid des Lichtsammelkomplexes), **D1** (Protein des Reaktionszentrums von PS II), **MSP** (*Manganese stabilizing protein*; Größe: 33 kDa; gehört zum Sauerstoff-entwickelnden Komplex (OEC) des Photosystems II (PS II) und ist eines der sogenannten extrinsischen Peptide), **Cytochrom *f*** (34 kDa Untereinheit des Cytochrom *b₆f* Komplexes), **CP47** (Chlorophyll-bindendes Protein der inneren Lichtantenne von PS II; Größe: 47 kDa; es bildet zusammen mit dem CP43 die Core-Lichtantenne von PS II), **α -Untereinheit des CF1** (Untereinheit des Kopplungsfaktors der Photophosphorylierung, Größe: 56 kDa), **PsaA/B Genprodukt** (Als Heterodimer bildet es das Reaktionszentrum von PS I und wird auch als CP1 (Chlorophyll-Protein 1) bezeichnet [Thornber, 1986]. Es läuft im SDS-Gel mit einem Molekulargewicht von ungefähr 66 kDa. Aus der bekannten Aminosäuresequenz leitet sich jedoch ein reelles Molekulargewicht von 83,2 kDa für das PsaA-Protein und eines von 82,5 kDa für das PsaB-Protein ab [Fish et al., 1985].)

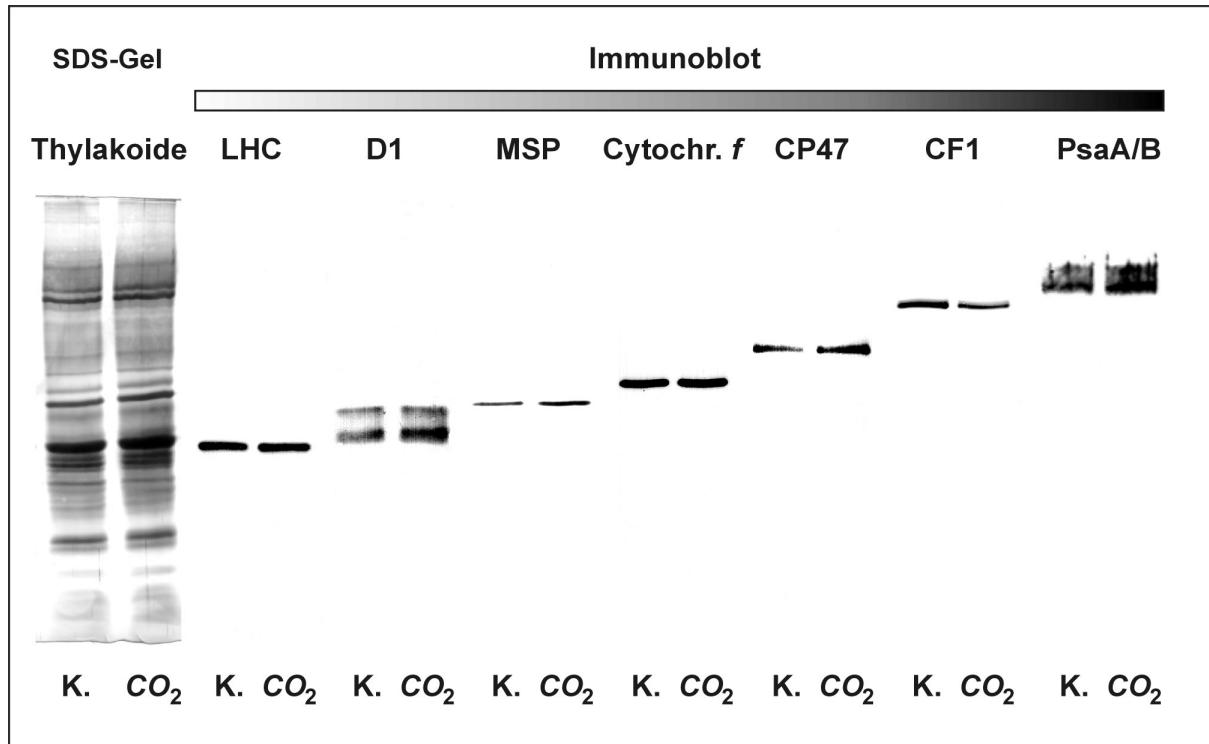
Die folgende Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Membrankomplexe des Photosyntheseapparates in Höheren Pflanzen. Die Polypeptide, deren quantitative Verteilung in der Thylakoidmembran der beiden Tabakpflanzen JWB und Su/su und ihrer CO_2 -Pflanzen untersucht wurden, sind farbig markiert.

Abbildung 3.19 Struktur und Anordnung der Membrankomplexe des Photosyntheseapparates in der Thylakoidmembran [Schmid, 1993].



Die in diesem Modell dargestellten Membrankomplexe sind in ihrem Aufbau vereinfacht. Die eingesetzten Antiseren sind gegen die farbig markierten Polypeptide des Photosyntheseapparates gerichtet. Die Chlorophyll-bindenden Peptide sind dabei grün dargestellt.

Abbildung 3.20 Quantitativer Vergleich ausgewählter Polypeptide des Photosyntheseapparates in isolierten Thylakoidmembranen von *Nicotiana tabacum* var. JWB, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm), mit Hilfe der Westernblot (Immunoblot)-Technik.



Eingesetzte Chlorophyllmenge für die Immunoblots: 0,5 µg, bei MSP : 0,35 µg; Eingesetzte Chlorophyllmenge für das SDS-Gel: 1 µg; Alter der Pflanzen: 28 Tage, Verdünnung der Antiseren: Anti-LHC (28 kDa Polypeptid): 1 zu 25000, Anti-D1: 1 zu 1000, Anti-MSP: 1 zu 2500, Anti-Cytochrom *f*: 1 zu 1000, Anti-CP47: 1 zu 2000, Anti-CF1 (α -Untereinheit): 1 zu 1000, Anti-PsaA/B (CP1): 1 zu 150

Die Abbildung 3.20 gibt den Vergleich der Verteilung der oben genannten Proteine des Photosyntheseapparates zwischen den isolierten Thylakoidmembranen der Kontroll- & CO₂-Pflanzen von JWB wieder. Die Konzentration der Thylakoidmembranen wurde auf Chlorophyll bezogen.

Die Anzucht der Tabakpflanze JWB unter einer erhöhten CO₂-Atmosphäre (700 ppm) führt zu deutlichen Veränderungen in der Verteilung von Proteinen des Photosyntheseapparates. Bezogen auf Chlorophyll nimmt in den Thylakoidmembranen der CO₂-Pflanzen das D1 (PsbA)- sowie das D2 (PsbD)-Protein (das Antiserum reagiert mit dem D2 Protein kreuz) beachtlich zu. Auch der Anteil des CP47 (PsbB) und des MSP (PsbO) steigt bei den CO₂-Thylakoidmembranen stark an. Das Reaktionszentrum von PS I (CP1, PsaA/B oder P700 genannt) wird in den CO₂-Thylakoidmembranen vermehrt eingebaut. Der Anteil an LHC, speziell am 28 kDa LHC Protein, nimmt in den Thylakoidmembranen der CO₂-Pflanzen nicht ab, sondern leicht zu. Die Menge an Cytochrom *f* bleibt in den CO₂-Thylakoidmembranen gegenüber der Kontrollpräparation konstant. Dagegen fällt die Markierung der α -Untereinheit des Kopplungsfaktors der Photophosphorylierung bei den CO₂-Thylakoidmembranen mit dem monospezifischen Antiserum deutlich kleiner aus. Es

kann also davon ausgegangen werden, dass die Menge an ATP-Synthetase in den Thylakoidmembranen der *CO₂-Pflanzen* von JWB stark abgenommen hat.

Die Anzucht der Tabakpflanze JWB unter einer erhöhten CO₂-Atmosphäre führt zu einer starken Reduktion der Anzahl der ATP-Synthase Komplexe in den Thylakoidmembranen.

Die Analyse der Verteilung bestimmter Proteine des Photosyntheseapparates in isolierten Thylakoidmembranen der Kontroll- & CO₂-Pflanzen von JWB bestätigt die Annahme, dass im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanzen* eine Verschiebung des Verhältnisses photosynthetische Reaktionszentren (II & I) zu Lichtsammelantennenkomplex (LHCI und II) in Richtung auf die photosynthetische Reaktionszentren (I & II) eingetreten ist.

Das Wachstum der Tabakpflanze JWB unter einer erhöhten CO₂-Atmosphäre (700 ppm) führt zu einem substantiellen Anstieg der Core-Komplexe von Photosystem I & II. Somit wird die photosynthetische Einheit, das ist die Zahl der Antennen-Chlorophylle pro Chlorophyll des Reaktionszentrums, kleiner. D.h. statistisch betrachtet nimmt die Menge an LHC pro Reaktionszentrum ab. Dennoch ist dieses Ergebnis ungewöhnlich, da bezogen auf Chlorophyll die Proteine CP47 (PsbB) und das PsaA/B-Genprodukt (CP1, P700) in den *CO₂-Thylakoidmembranen* stark zunehmen, während der Anteil des 28 kDa LHCII-Polypeptids im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanzen* praktisch keinerlei Veränderung erfahren hat. Nun tragen aber all diese Proteine (CP47, das PsaA/B-Genprodukt & das 28 kDa LHCII-Polypeptid) Chlorophyll. Das CP47-Polypeptid als auch das PsaA/B-Heterodimer (CP1) binden nur Chlorophyll a. Das 28 kDa LHCII-Polypeptid bindet neben Chlorophyll a auch Chlorophyll b. Die Analyse der Chlorophyllzusammensetzung isolierter Thylakoidmembranen, als auch der PS II-Membranen und der nativen PS I-Komplexe aus den Kontroll- & CO₂-Pflanzen von JWB erbrachte keine signifikanten Unterschiede im Verhältnis der Chlorophyllmoleküle a zu b (w/w). Auch der Gesamtchlorophyllgehalt pro cm² Blatt erfährt bei Anzucht der Tabakpflanze JWB unter erhöhtem CO₂ keinerlei Veränderung (siehe Ergebnisabschnitt 3.3).

Dies bedeutet, dass einige der Proteine des Photosyntheseapparates, die Chlorophyll binden, weniger oder im Extremfall überhaupt kein Chlorophyll a gebunden haben.

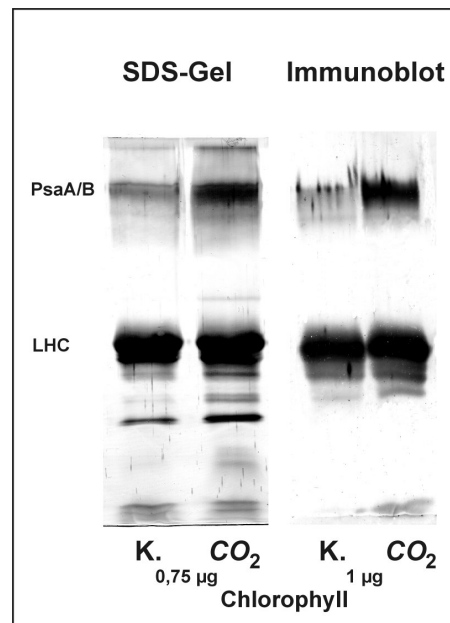
Denn wie bereits beschrieben bindet nur eine Gruppe von Chlorophyll-bindenden Proteinen, nämlich die zu der Familie der kerncodierten Cab-Proteine gehörenden, neben Chlorophyll a auch Chlorophyll b. Diese bilden den Light-harvesting-complex (LHC I & II). Dies bedeutet, dass Chlorophyll b nur am LHC (I & II) des Photosyntheseapparates gebunden ist [Yamamoto and Bassi, 1996]. Da das Chlorophyll a/b Verhältnis (w/w) aller Präparationen (Chloroplasten, Thylakoidmembranen, PS II-Membranen & PS I-Komplexe) als auch der Gesamtchlorophyllgehalt pro cm² Blatt, sowie der Anteil des 28 kDa LHCII-Polypeptids in den Thylakoidmembranen der *CO₂-Pflanzen* gegenüber den Kontrollen unverändert geblieben ist, kann davon ausgegangen werden, dass am LHC (I & II) im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanze* von JWB alle verfügbaren Bindungsstellen für Chlorophyll b auch mit Chlorophyll b besetzt sind. „Normalerweise“ wäre bei einer Zunahme der Core-Komplexe der beiden Photosysteme (I & II), die ja bekanntlich nur Chlorophyll a binden, eine deutliche

Zunahme des Chlorophyll a/b Verhältniswertes (w/w) der isolierten Thylakoidmembranen zu beobachten. Dies ist jedoch nicht der Fall. Ob das CP 43 (PsbC), welches ebenfalls nur Chlorophyll a bindet, in den Thylakoidmembranen der *CO₂-Pflanzen* von JWB dafür abnimmt, ist hier nicht expliziert aufgezeigt. Es wird vermutet, dass der PS II-Core-Komplex in seiner funktionellen Form als Dimer vorliegt [O. Kruse, D. Zheleva, J. Barber, 1997]. Untersuchungen zur dreidimensionalen Struktur von Photosystem II deuten auf eine feste Stöchiometrie der im PS II-Core-Komplex vorhandenen Untereinheiten hin. D.h., dass auf ein Reaktionszentrum (D1/D2 + Chlorophyllpigment P680) von PS II jeweils ein CP47 und ein CP43 zugeordnet wird [Hankamer und Barber, 1997]. Zusammen mit der Untereinheit Cytochrom *b* 559 und den extrinsischen Polypeptiden des Sauerstoffentwickelnden Komplexes bildet das Reaktionszentrum (P680) den Core-Komplex von PS II [Richter, 1996]. Demnach ist es durchaus möglich, dass bei einer Zunahme der D1 Proteine in den Thylakoidmembranen auch die CP47 (PsbB)- und die CP43 (PsbC)-Polypeptide zunehmen. Nun ist es so, dass in den *CO₂-Thylakoidmembranen* von JWB eine Zunahme der Apoproteine der beiden photosynthetischen Core-Komplexe (I & II) beobachtet wird, wobei der Chlorophyll a Anteil jedoch konstant bleibt. Bei einer biochemisch „normalen“ Reaktion wäre auch der Chlorophyll a Anteil angestiegen.

Die Anzucht des Tabakwildtyps JWB unter erhöhtem CO₂ (700 ppm) führt in den Thylakoidmembranen zu einem Anstieg der Apoproteine der Core-Komplexe der beiden Photosysteme (I & II).

Am Beispiel isolierter nativer PS I-Komplexe aus den Kontroll- & CO₂-Pflanzen von JWB wird dies besonders deutlich. Die folgende Abbildung 3.21 zeigt den Vergleich der Markierung der isolierten nativen PS I-Komplexe mit Antikörpern, die gegen das PsaA/B-Heterodimer (CP1, P700) und gegen das 28 kDa LHC Protein gerichtet sind.

Abbildung 3.21 Immunologischer Nachweis des PsaA/B Heterodimers (CP1, P700) und des 28 kDa LHC-Polypeptids in isolierten nativen PS I-Komplexen von *Nicotiana tabacum* var. JWB, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm), mit Hilfe der Westernblot (Immunoblot)-Technik.



Alter der Pflanzen: 26 Tage

Das Antiserum gegen das 28 kDa LHCII-Polypeptid reagiert aufgrund der hohen Probenkonzentration mit den gesamten LHC (I & II)-Polypeptiden, die am PS I assoziiert sind, kreuz. Die Konzentration der beiden PS I-Proben für die Auftrennung der einzelnen Polypeptide in der SDS-Gelelektrophorese wurde auf Chlorophyll bezogen. Schon im SDS-Gel der beiden PS I-Präparationen sieht man eine deutliche Zunahme der Reaktionszentren (CP1, P700, PsaA/B-Genprodukt) von PS I im nativen PS I-Komplex der CO₂-Pflanze von JWB, während die LHC (I & II)-Polypeptide im CO₂ PS I-Komplex gegenüber der Kontrollpräparation nicht abnehmen. Dies wird im Westernblot der beiden PS I-Präparationen bestätigt (siehe Abbildung 3.21). Es ist eher eine leichte Zunahme der LHC (I & II)-Polypeptide in den nativen PS I-Komplexen der CO₂-Pflanzen zu erkennen.

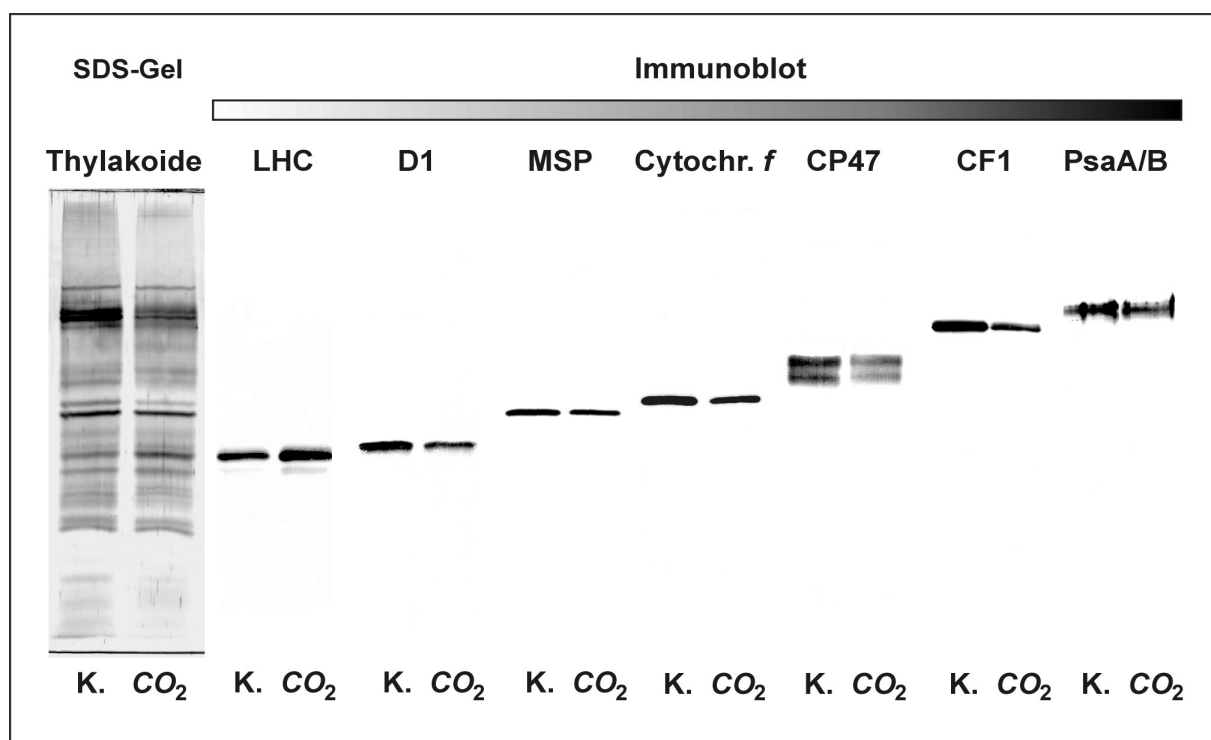
Das heißt, dass in den isolierten PS I-Komplexen der CO₂-Pflanzen von JWB ein Teil der Chlorophyll-bindenden Proteine wenig oder überhaupt kein Chlorophyll gebunden haben. Denn das mittlere Chlorophyll a/b Verhältnis der isolierten nativen PS I-Komplexe aus den CO₂-Pflanzen von JWB zeigt keine signifikante Veränderung zu den entsprechenden Kontrollpräparationen (siehe Tabelle 3.5 auf Seite 74). Somit sind im nativen PS I-Komplex der CO₂-Pflanzen alle Bindungsstellen für Chlorophyll b, und diese befinden sich nur an den LHC (I & II)-Polypeptiden, mit Chlorophyll b auch tatsächlich besetzt. Die Zunahme der Apoproteine des Reaktionszentrums (CP1, PsaA/B-Heterodimer, P700) von PS I hat zu keinem Anstieg der Chlorophyll a-Moleküle im nativen PS I-Komplex der CO₂-Pflanzen von JWB geführt.

Dies läßt darauf schließen, dass das Chlorophyll a im PS I-Komplex der CO_2 -Pflanzen von JWB unregelmäßig verteilt sein muß. Denn der deutliche Anstieg des Reaktionszentrums (CP1, PsaA/B-Genprodukt) in den nativen PS I-Komplexen der CO_2 -Pflanzen hätte das Verhältnis von Chlorophyll a zu b in den nativen CO_2 -PS I-Komplexen deutlich zu Gunsten des Chlorophyll a verschieben müssen. Dies wird aber nicht beobachtet.

Anhand der strukturellen Veränderung im nativen Photosystem I-Komplex aus den CO_2 -Pflanzen von JWB wird deutlich:

Die Anzucht der Tabakpflanze JWB unter einer erhöhten CO_2 -Atmosphäre (700 ppm) bewirkt einen Bruch in der Koordination der Biosynthese der Chlorophyll a-Moleküle und der Synthese der Core-Komplexe der beiden Photosysteme (I & II).

Abbildung 3.22 Quantitativer Vergleich ausgewählter Polypeptide des Photosyntheseapparates in isolierten Thylakoidmembranen von *Nicotiana tabacum* Aureamutante Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO_2 -Konzentration (700 ppm), mit Hilfe der Westernblot (Immunoblot)-Technik.



Eingesetzte Chlorophyllmenge für die Immunoblots: 0,5 μ g, eingesetzte Chlorophyllmenge für das SDS-Gel: 0,5 μ g; Alter der Pflanzen: 35 Tage, Verdünnung der Antiseren: Anti-LHC (28 kDa Polypeptid): 1 zu 25000, Anti-D1: 1 zu 1000, Anti-MSP: 1 zu 2500, Anti-Cytochrom f: 1 zu 1000, Anti-CP47: 1 zu 2000, Anti-CF1 (α -Untereinheit): 1 zu 1000, Anti-PsaA/B (CP1): 1 zu 150

Die Abbildung 3.22 zeigt den quantitativen Vergleich der Markierung ausgewählter Polypeptide des Photosyntheseapparates in isolierten Thylakoidmembranen der chlorophyllarmen Tabakmutante Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter

CO₂-Konzentration (700 ppm). Die Konzentration der Thylakoidmembranen wurde für diese Untersuchung auf Chlorophyll bezogen. **Auf den ersten Blick erkennt man, dass die Anzucht der Tabakmutante Su/su unter einer erhöhten CO₂-Konzentration (700ppm) eine deutliche Veränderung in der quantitativen Verteilung bestimmter Polypeptide des Photosyntheseapparates bewirkt.**

In den *CO₂-Thylakoidmembranen* kommt es zu einem starken Anstieg des 28 kDa LHCII-Polypeptids, während die Polypeptide des D1 (PsbA), des MSP (PsbO), des CP47 (PsbB) und des PsaA/B-Genproduktes (CP1) gegenüber den Kontroll-Thylakoidmembranen wesentlich schwächer mit den jeweiligen monospezifischen Antiserum markiert werden. Auch die Cytochrom f-Untereinheit des Cytochrom *b₆f*-Komplexes wird in den isolierten Thylakoidmembranen der *CO₂-Pflanzen* erheblich schwächer markiert. Die Immunreaktion gegen die α -Untereinheit des ATP-Synthetase-Komplexes mit dem entsprechendem Antiserum fällt in den *CO₂-Thylakoidmembranen* ebenfalls beträchtlich schwächer aus.

Die Zunahme des 28 kDa LHCII-Polypeptides in den Thylakoidmembranen der *CO₂-Pflanzen* führt zu einer entsprechenden Abnahme der chlorophyllbindenden-Polypeptide (CP47, PsaA/B) der Core-Komplexe von Photosystem I & II, da für diesen Test die Menge an Thylakoidmembranen auf Chlorophyll bezogen wurde. Diese Anpassung des Photosyntheseapparates der chlorophyllarmen Mutante Su/su an eine erhöhte CO₂-Atmosphäre (700 ppm) führt auch zu einer starken Abnahme des Chlorophyll a/b Verhältnisses (w/w) der *CO₂-Thylakoidmembranen* gegenüber den entsprechenden Kontrollpräparationen (siehe Tabelle 3.3 auf Seite 68). Denn die Zunahme der LHC (I & II)-Polypeptide bei gleichzeitiger Reduktion der Core-Polypeptide der beiden Photosysteme (I & II) im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanzen* von Su/su muß zu einer Abnahme des Chlorophyll a/b Verhältnisses (w/w) der isolierten *CO₂-Thylakoidmembranen* führen, da Chlorophyll b nur am LHC (I & II) gebunden ist [Yamamoto and Bassi, 1996]. Das Ergebnis der Analyse der quantitativen Verteilung bestimmter Polypeptide des Photosyntheseapparates der Kontroll- & CO₂-Pflanzen von Su/su in Abbildung 3.22 bestätigt die aus der Analyse der Pigmentzusammensetzung abgeleitete Schlußfolgerung, dass im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanzen* von Su/su eine Verschiebung des Verhältnis photosynthetische Reaktionszentren (I & II) zu LHC (I & II) in Richtung LHC eingetreten ist. **Das Wachstum der Tabakaureamutante Su/su unter einer erhöhten CO₂-Atmosphäre (700ppm) führt im Photosyntheseapparat zu einer Zunahme des LHC (I & II) bei gleichzeitiger Reduktion der Core-Komplexe von Photosystem I & II. Dies bedeutet, dass die photosynthetische Einheit stark zunimmt.**

3.8 Bestimmung des Gehaltes an ATP in isolierten Chloroplasten

Das Wachstum der beiden Tabakpflanzen unter erhöhtem CO₂ (700 ppm) hat einen Einfluß auf den Gehalt an ATP-Synthase-Komplexen im Photosyntheseapparat. Dieser ist in isolierten Thylakoidmembranen der CO₂-Pflanzen von JWB und Su/su beträchtlich reduziert (siehe Abb.3.20 auf Seite 102 und Abb.3.22 auf Seite 106). Es lag daher nahe zu untersuchen, ob die Abnahme der ATP-Synthase-Komplexe in den Thylakoidmembranen der CO₂-Pflanzen von JWB und Su/su einen Einfluß auf den ATP-Gehalt in isolierten Chloroplasten hat.

Die folgende Tabelle gibt das Ergebnis der ATP-Konzentrationsbestimmung in isolierten Chloroplasten der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su wieder.

Tabelle 3.17 ATP-Konzentrationen in isolierten Chloroplasten von *Nicotiana tabacum* var. JWB und der Aureamutante Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm).

	JWB Chloroplasten		Su/su Chloroplasten	
	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂
ng ATP / mg Chlorophyll	8,72 ± 3,8	6,1 ± 2,6	49,79 ± 20,91	42,11 ± 17,69
ng ATP / mg Protein*	1,32	1,15	1,41	1,76

Die Zahl der ATP-Konzentrationsbestimmungen in den jeweiligen Chloroplastenpräparaten (Kontroll- & CO₂-Ansatz) lag bei n = 18. Es wurden innerhalb eines Tages mehrere Messungen durchgeführt. Der Untersuchungszeitraum lag für den Wildtyp JWB zwischen September und Oktober und für die Aureamutante Su/su zwischen Oktober und November.

* theoretisch berechnet aus dem Protein / Chlorophyll Verhältnis von Chloroplasten aus Tab. 3.2 auf Seite 65, Alter der Pflanzen: JWB: 24 – 28 Tage; Su/su: 33 – 38 Tage

Tabelle 3.17 zeigt das Ergebnis der ATP-Konzentrationsbestimmungen.

Bei den beiden Tabakpflanzen hat die starke Abnahme der ATP-Synthase-Komplexe in den Thylakoidmembranen der CO₂-Pflanzen einen Einfluß auf die ATP-Konzentration in isolierten Chloroplasten. Pro mg Chlorophyll fällt die ATP-Konzentration in den CO₂-Chloroplasten der beiden Tabakpflanzen deutlich ab (- 30 % bei JWB & - 15 % bei Su/su). Bezieht man die ATP-Konzentration in Chloroplasten auf mg Protein, so fällt die Abnahme der ATP-Menge beim Wildtyp JWB nicht mehr so hoch aus (- 13 % bei JWB). Bei der chlorophyllarmen Mutante Su/su steigt der ATP-Gehalt in den CO₂-Chloroplasten bezogen auf mg Protein dagegen an (25 % bei Su/su).

Der generell größere Gehalt an ATP pro mg Chlorophyll in den Chloroplasten von Su/su gegenüber denen des Wildtyps JWB ist auf den unterschiedlichen Gehalt an Chlorophyll in den Chloroplasten zurückzuführen. Das Protein/Chlorophyll-Verhältnis der Kontroll-Chloroplasten von Su/su liegt im Jahresmittel bei 35,2 und das des Wildtyps JWB bei 6,6

(siehe Tabelle 3.2 auf Seite 65). Bezieht man die ATP-Konzentration in den Chloroplasten auf mg Protein, so fällt der Anteil an ATP in den Kontroll-Chloroplasten von JWB und Su/su in etwa gleichhoch aus.

Der ATP-Synthase-Komplex ist Bestandteil des Photosyntheseapparates. Dieser ist bekanntlich in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten lokalisiert. Daher ist in der folgenden Tabelle die ATP-Konzentration auf die in der Thylakoidmembran befindlichen Proteine bezogen, um herauszufinden, ob die strukturelle Veränderung des Photosyntheseapparates der *CO₂-Pflanzen* von JWB & Su/su einen Einfluß auf die ATP-Synthese hat.

Tabelle 3.18 ATP-Konzentration bezogen auf mg Thylakoidmembran-Protein der beiden Tabakpflanzen N.t.var. JWB und Mutante Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm).

	JWB Thylakoidmembran		Su/su Thylakoidmembran	
	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂
ng ATP / mg Protein*	1,43	0,94	2,84	3,91

* theoretisch berechnet aus dem Protein / Chlorophyll Verhältnis der Thylakoidmembranen (siehe Tab. 3.3 auf Seite 68)

Wird die ATP-Konzentration auf die in den Thylakoidmembranen gebundenen Proteine bezogen, so fällt die ATP-Menge bei dem Wildtyp JWB um 34 % kleiner aus. Dagegen steigt der ATP-Gehalt bei der chlorophyllarmen Mutante Su/su um 38 % an.

Bei dem Wildtyp JWB fällt der Gehalt an ATP in isolierten Chloroplasten im Bezug auf mg Chlorophyll und mg Chloroplasten-Protein als auch auf mg Thylakoidmembran-Protein deutlich ab.

Die verminderte Biosynthese der ATP-Synthase-Komplexe im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanzen* von JWB, die eine Anpassung an eine erhöhte CO₂-Atmosphäre (700 ppm CO₂) ist, führt gegenüber den Kontrollanzuchten in den Chloroplasten zu einem niedrigeren ATP-Spiegel.

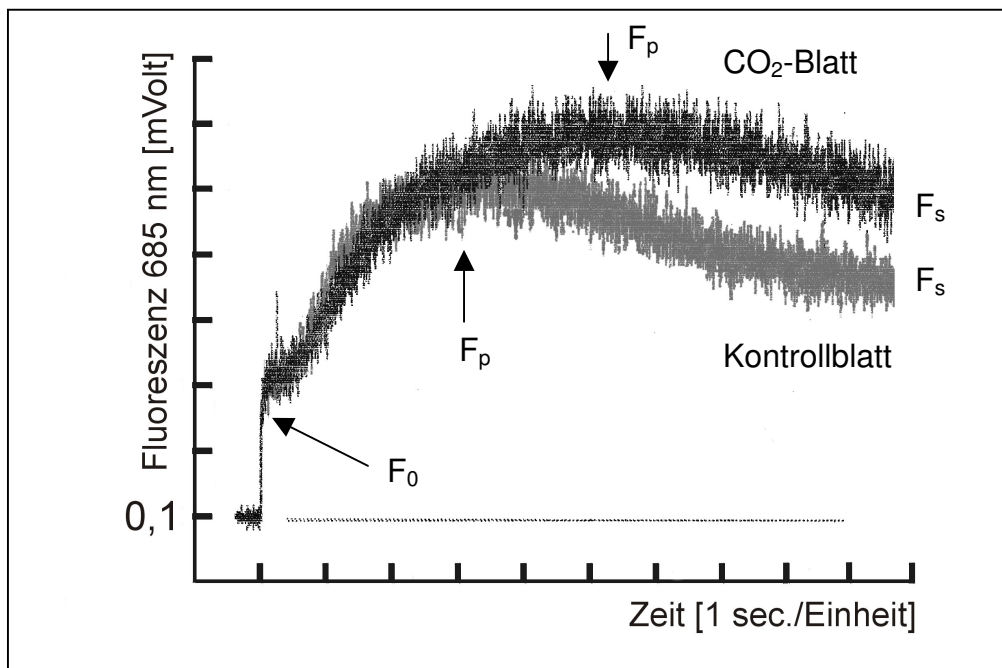
Die Anzucht der Aureamutante Su/su unter erhöhtem CO₂ bewirkt bekanntlich einen starken Anstieg des LHC (I & II) im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanzen*. Gleichzeitig ist die Synthese der Core-Komplexe der beiden Photosysteme I & II und der der ATP-Synthase-Komplexe erheblich vermindert (siehe Abb. 3.22 auf Seite 106). Dennoch fällt der Gehalt an ATP in isolierten Chloroplasten der *CO₂-Pflanzen* gegenüber den Kontrollanzuchten von

Su/su im Bezug auf mg Chlorophyll nur um 15 % kleiner aus. Wird die ATP-Konzentration auf mg Chloroplasten-Protein oder auf mg Thylakoidmembran-Protein bezogen, so fällt diese bei den *CO₂-Pflanzen* gegenüber den Kontrollen deutlich höher aus. Dabei ist der Unterschied im ATP-Gehalt zwischen den Kontroll- & *CO₂-Chloroplasten* von Su/su am Größten, wenn man die ATP-Konzentration auf mg Thylakoidmembran-Protein bezieht. Der Abfall des ATP-Spiegels bezogen auf mg Chlorophyll in den *CO₂-Chloroplasten* von Su/su gegenüber den entsprechenden Kontrollpräparationen beruht letztlich auf dem niedrigerem Gehalt an ATP-Synthase-Komplexen in den *CO₂-Thylakoidmembranen*. Bezogen auf mg Protein liegt der ATP-Spiegel der *CO₂-Chloroplasten* allerdings über dem der Kontroll-Chloroplasten. Dieses ist eine Konsequenz aus der Veränderung der Protein/Chlorophyll Verhältnisse der *CO₂-Chloroplasten* & *-Thylakoidmembranen* gegenüber den jeweiligen Kontrollpräparationen (siehe Tab. 3.2 & 3.3 auf Seite 65 & 68).

3.9 **Fluoreszenzinduktionskinetik dunkeladaptierter Blätter und Chloroplasten der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm).**

Die Kinetik der Fluoreszenzinduktion von dunkeladaptierten Blättern und Chloroplasten wurde bei 685 nm und bei Raumtemperatur aufgenommen. Die so erhaltenen Fluoreszenzkinetiken geben praktisch ausschließlich die Fluoreszenzemission von Photosystem II (PS II) wieder. Das Ausmaß der Fluoreszenz spiegelt den Redoxzustand des Primärakzeptor Q_a von Photosystem II wieder. Um die maximale Fluoreszenz der Blätter und Chloroplasten bei 685 nm zu messen, wurden die Blätter als auch die Chloroplasten mit DCMU behandelt. DCMU bindet an der Q_b -Bindungsstelle des PS II (D1-Untereinheit von PS II) und hemmt den Elektronenabfluss von Photosystem II. Der Elektronenfluß vom PS II zum PS I kommt zum Erliegen. Da die Elektronen nicht mehr fließen können, kann die am LHC II und am CP43 & CP47 absorbierte Energie vom PS II nicht verwertet werden und wird letztendlich als Fluoreszenzstrahlung abgegeben. Auf diese Weise kann die maximale Fluoreszenz F_m , bei der Q_a (Primärakzeptor von PS II) & auch Q_b (Plastochinonpool) vollständig reduziert vorliegen, gemessen werden [Hipkins and Baker, 1986].

Abbildung 3.23a Kinetik der Fluoreszenz (685 nm) von dunkeladaptierten Blättern der Tabakpflanze N.t.var. JWB, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO_2 -Konzentration (700 ppm).



Die Abbildung 3.23a gibt die Fluoreszenzkinetiken eines Blattes der Kontroll- & CO_2 -Pflanzen von JWB wieder. Es wurde jeweils das dritte Blatt, ausgehend von den Spitzenmeristemen, verwendet. Zusätzliche Bedingung für die Auswahl der Blätter war, daß sie nicht durch andere benachbarte Blätter beschattet wurde. Die Abbildung 3.23a zeigt die Fluoreszenzkinetik der Blätter ohne chemische Zusätze. Beide Blatt-Typen (*Kontrolle*, CO_2) zeigen die typische „Kautsky-Kurve“. Dennoch zeigen sich auch deutliche Unterschiede in der Kinetik. Während der Kurvenverlauf der Fluoreszenzinduktionskinetik der Kontrollblätter nach dem Erreichen der kurzfristigen maximalen Fluoreszenz (F_p) sehr schnell abfällt, ist dieser Abfall von F_p nach F_s (Steady-state Fluoreszenz) bei den CO_2 -Blättern deutlich verzögert, wie die Abbildung 3.23a zeigt. Der Abfall der Fluoreszenzkinetik vom Punkt F_p nach F_s beruht auf der schnellen Anpassung des gesamten Photosyntheseapparates nach Einschaltung der Belichtung der dunkeladaptierten Blätter. Der Punkt F_p in der Fluoreszenzinduktionskinetik dunkeladaptierter Blätter spiegelt den maximalen physiologischen Reduktionszustand von Q_a (Primärakzeptor von PS II) und Q_b wieder. Dieser ist aber nicht mit dem *absolut möglichen* (maximalen) Reduktionszustand von Q_b identisch. Um den maximalen Reduktionszustand von Q_b zu ermitteln, werden die Blätter mit DCMU behandelt. Somit wird der Elektronentransport von Q_b zum Plastochinonpool unterbunden. Der Abfall der Fluoreszenzinduktionskurve von F_p nach F_s beruht auf der zunehmenden Oxidation von Q_b durch PS I. Dabei kommt es innerhalb des Photosyntheseapparates zu einer Wanderungsbewegung von Teilen des LHCII vom PS II zum PS I. Eine notwendige Vorbedingung für diesen Prozeß, den man auch als *Spill-over* bezeichnet, ist die Phosphorylierung bestimmter LHCII-Polypeptiden mittels einer Proteinkinase (auch als LHCII-Kinase bezeichnet [Hauska et al., 1996]). Die Phosphorylierung bestimmter LHCII-

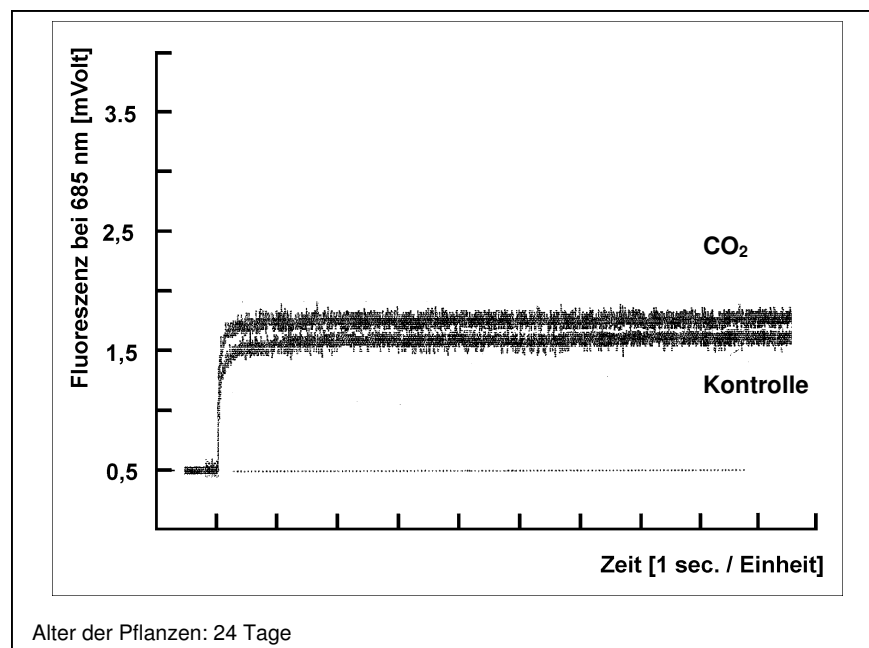
Polypeptide erleichtert die Ablösung der selben vom Photosystem II. Dabei soll der Cytochrom *b₆/f*-Komplex als Redox-Sensor fungieren [Allen, 1992]. Als Maß zur Bestimmung des Redoxzustandes des Photosyntheseapparates dient höchstwahrscheinlich der Plastochinonpool [Hauska et al., 1996]. Die vom LHCII aufgenommene Lichtenergie wird über diesen Mechanismus (*Spill-over*) auf das Photosystem I (PS I) übertragen. Da nun das Photosystem I über die phosphorylierten LHCII-Proteine genügend Lichtenergie aufnehmen kann, ist es in der Lage über den Cytochrom *b₆/f*-Komplex den Plastochinonpool zu oxidieren. Dies erhöht den Wirkungsgrad der Energieausnutzung, somit wird die Photosynthese effektiver und die Fluoreszenz nimmt ab.

Die deutlich verzögerte Abnahme der Fluoreszenzinduktionskurve von F_p nach F_s bei den *CO₂-Blättern* gegenüber den Kontrollen von JWB beruht auf einer schlechteren Kopplung der beiden Photosysteme (I & II) im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanzen* von JWB. Damit ist gemeint, daß die Energieverteilung zwischen PS II & I über die phosphorylierten Anteile des LHCII im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanzen* gegenüber den Kontrollanzuchten nicht so optimal verläuft. Ein weiterer Grund für die verzögerte Abnahme der Fluoreszenz nach dem Erreichen der physiologisch maximalen Fluoreszenz am Punkt F_p in der Fluoreszenzinduktionskurve der *CO₂-Blätter* von JWB liegt in der dramatischen Reduzierung der ATP-Synthase-Komplexe in den Thylakoidmembranen der *CO₂-Pflanze* (siehe Abbildung 3.20 auf Seite 102). Denn die starke Verringerung der ATP-Synthase-Komplexe hat einen großen Einfluß auf den ΔpH im Thylakoidsystem der *CO₂-Pflanzen*. Dieser wird im Vergleich zu den Kontrollen erhöht sein. Der Anstieg des ΔpH führt im Photosyntheseapparat zu einer Verlangsamung des photosynthetischen Elektronentransports [Lawlor, 1990]. D.h., daß pro Zeiteinheit weniger Elektronen über die photosynthetische Elektronentransportkette von PS II nach PS I fließen können. Dies verzögert die Abnahme der Fluoreszenz nach Erreichen des F_p in der Fluoreszenzinduktionskurve der *CO₂-Blätter* von JWB.

Der Vergleich der Fluoreszenzinduktionskurven dunkeladaptierter Blätter der Kontroll-& *CO₂-Pflanzen* von JWB in Abbildung 3.23a zeigt noch ein anderes Ergebnis. Die kurzfristige maximale Fluoreszenz F_p fällt in der Fluoreszenzinduktionskurve der *CO₂-Blätter* deutlich größer aus. Zudem tritt sie zeitlich später auf. Im Durchschnitt erreichen die Parameter F_o, F_p und F_s der Fluoreszenzinduktionskurven der *CO₂-Pflanzen* gegenüber den Kontrollanzuchten von JWB um 20 bis 30 % höhere Werte (In der Abbildung 3.23a ist die „Steady-state fluorescence“ F_s der Blätter noch nicht erreicht. Die F_s wurde nach einer 5-minütigen Dauerbelichtung der Blätter gemessen.). Dies bedeutet, daß die Fluoreszenz der *CO₂-Blätter* gegenüber den Kontrollblättern grundsätzlich erhöht ist. Hierfür kann nur die strukturelle Veränderung des Photosyntheseapparates im Bereich des Photosystems II verantwortlich sein (Anstieg der Apoproteine von PS II bei unverändertem Gehalt an LHC II und der daraus resultierende Chlorophyll a-Mangel). Hinzu kommt die große Verringerung der Anzahl der ATP-Synthase-Komplexe in den Thylakoidmembranen der *CO₂-Pflanzen*. Denn ein gegenüber den Kontrollanzuchten stark verminderter Anteil an ATP-Synthase-Komplexen führt zu einer erheblich stärkeren Kopplung der photosynthetischen Aktivität der beiden

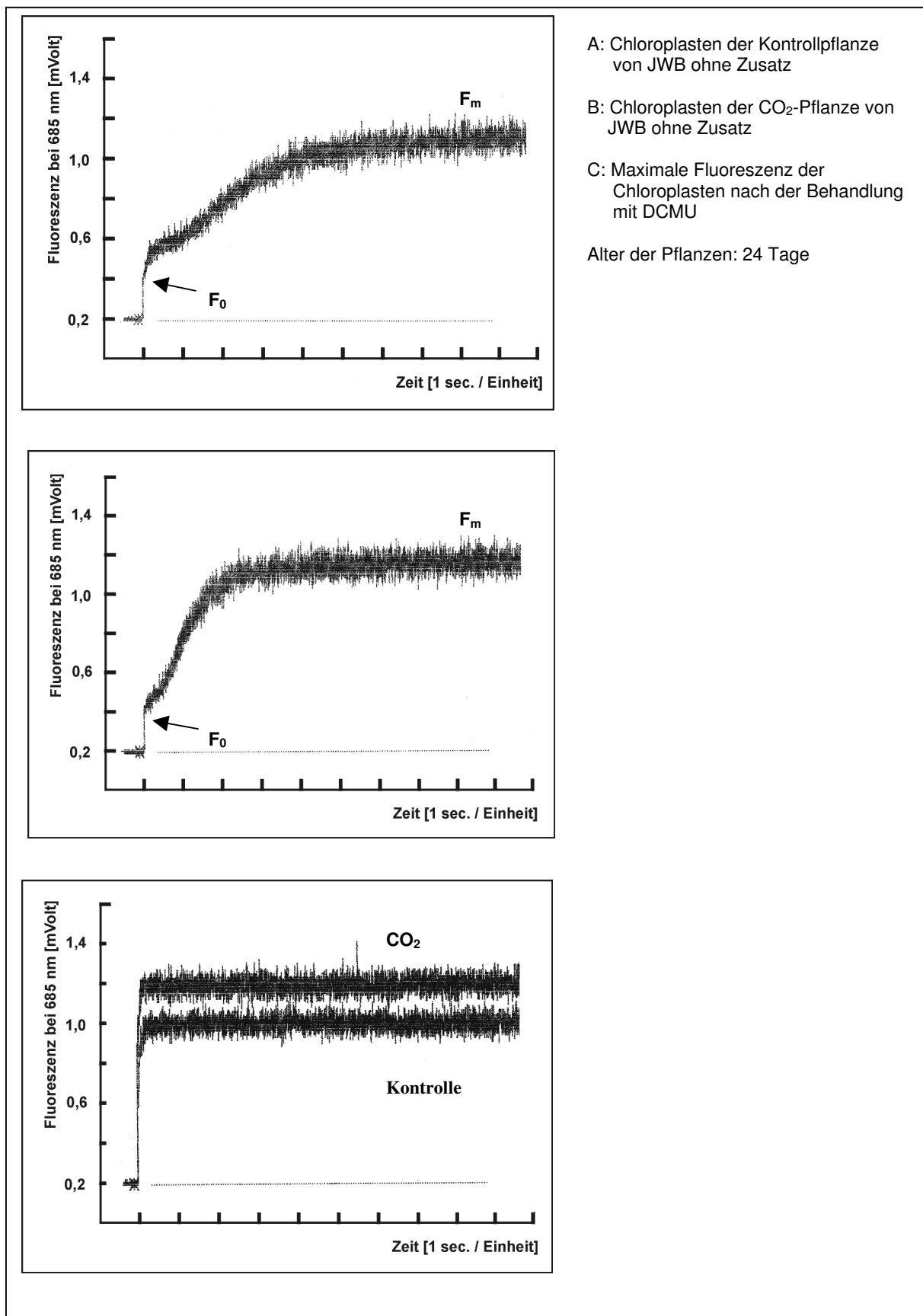
Photosysteme (I & II) mit der Photophosphorylierung. Die stärkere Kopplung reduziert die Aktivität der beiden Photosysteme (I & II) im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanzen*. Die Erniedrigung der Aktivität der beiden Photosysteme beruht höchstwahrscheinlich auf den höheren ΔpH -Wert zwischen dem Chloroplastenstroma und dem Intrathylakoidraum im Chloroplast der *CO₂-Pflanze*, verursacht durch die Abnahme an ATP-Synthase-Komplexen in der Thylakoidmembran. Im Vergleich zu den Kontroll-Pflanzen ist davon auszugehen, daß dies zu einer stärkeren Ansäuerung durch Protonen (H^+ -Ionen) im Intrathylakoidraum der *CO₂-Chloroplasten* führt. Der niedrigere pH-Wert im Intrathylakoidraum der *CO₂-Chloroplasten* hemmt die Aktivität der beiden Photosysteme (I & II). Dies erhöht ebenfalls die Fluoreszenz der *CO₂-Blätter*. Die zeitliche Verschiebung der kurzfristigen maximalen Fluoreszenz F_p der *CO₂-Blätter* gegenüber den Kontrollen kann eine Konsequenz der beträchtlichen Zunahme des Plastochinongehaltes in den Thylakoidmembranen der *CO₂-Pflanzen* von JWB sein (siehe Tabelle. 3.11 auf Seite 87).

Abbildung 3.23b Fluoreszenzkinetik (685 nm) von Blättern von *Nicotiana tabacum* var. JWB, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO_2 -Konzentration (700 ppm).



Die Abbildung 3.23b zeigt die Fluoreszenzinduktionskinetik der mit DCMU behandelten Blätter der Kontroll- & CO_2 -Pflanzen von JWB. Die Blockade des Elektronentransports von Q_b zum Plastochinonpool führt nach Einschaltung der Belichtung zu einem sofortigen Anstieg der Fluoreszenz. Diese durch die Behandlung der Blättern mit DCMU verursachte maximale Fluoreszenz F_m spiegelt den physiologischen Zustand des Photosyntheseapparates wieder, bei dem Q_a und Q_b als auch der Plastochinonpool vollständig reduziert vorliegen. Die höhere maximale Fluoreszenz F_m der *CO₂-Blätter* beruht auf dem großen Anstieg des Plastochinongehaltes in den Thylakoidmembranen als auch auf den Chlorophyll a-Mangel im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanzen* von JWB (siehe Tabelle 3.11 auf Seite 87).

Abbildung 3.24 Fluoreszenzkinetik (685 nm) von Chloroplasten von *Nicotiana tabacum* var. JWB, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm).

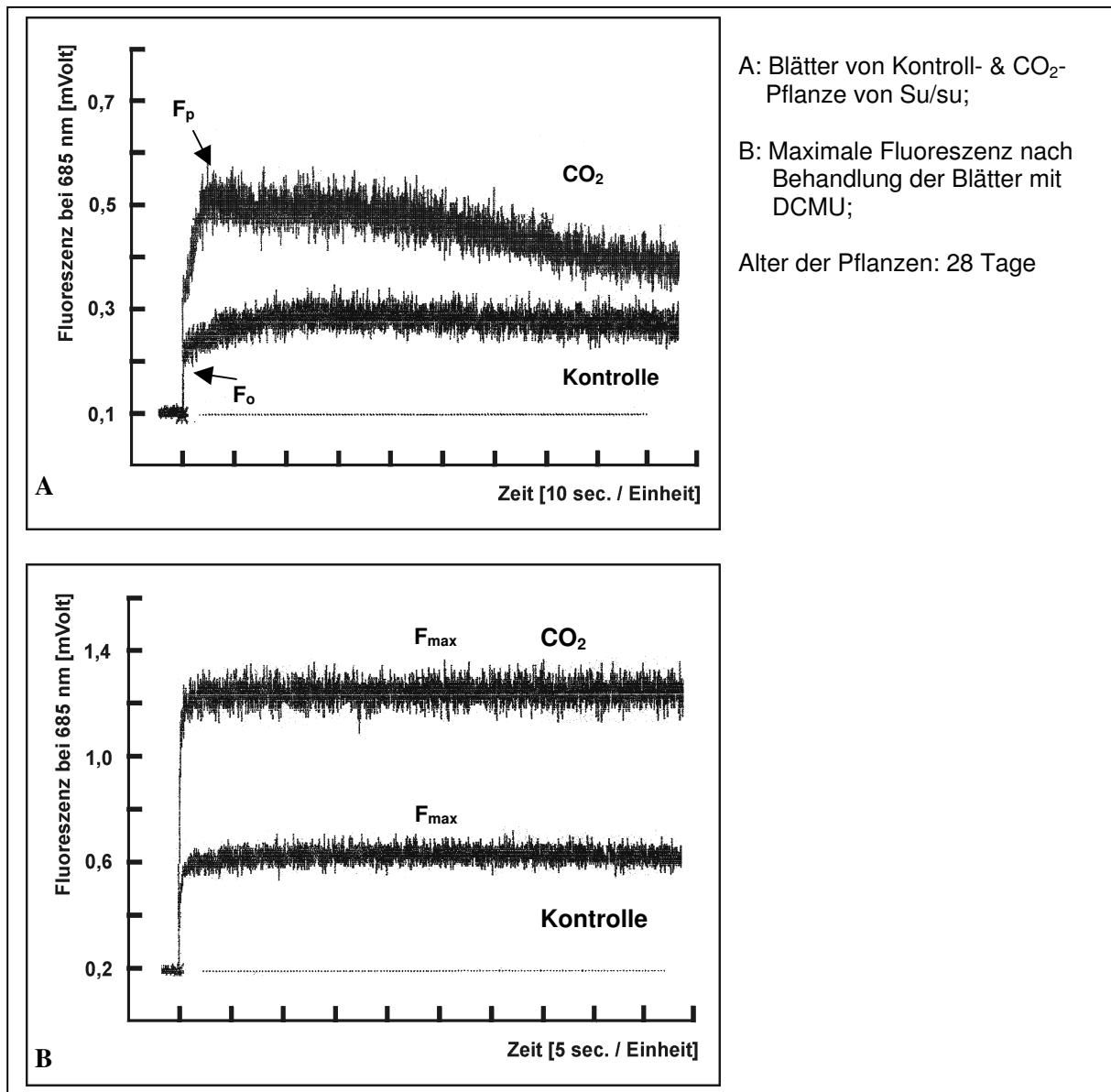


A: Chloroplasten der Kontrollpflanze von JWB ohne Zusatz
 B: Chloroplasten der CO₂-Pflanze von JWB ohne Zusatz
 C: Maximale Fluoreszenz der Chloroplasten nach der Behandlung mit DCMU
 Alter der Pflanzen: 24 Tage

Die Abbildung 3.24 A & B zeigt den Vergleich der Fluoreszenzinduktionskinetik dunkeladaptierter Chloroplasten der Kontroll- (Abb.: 3.24 A) & CO₂-Chloroplasten (Abb.: 3.24 B) von JWB. Beide Abbildungen (A & B) zeigen den typischen Verlauf der Fluoreszenzinduktionskinetik isolierter Tabak-Chloroplasten. Es sind aber auch deutliche Unterschiede in der Kinetik der Fluoreszenzinduktionskurven der Kontroll- & CO₂-Chloroplasten zu erkennen. Die Induktionskurve der Fluoreszenzkinetik steigt bei den JWB *CO₂-Chloroplasten* gegenüber den Kontroll-Chloroplasten wesentlich schneller an. Im Mittel benötigen die Kontroll-Chloroplasten 1,232 Sekunden um die halb maximale Fluoreszenz (F_{max}/2) zu erreichen. Bei den *CO₂-Chloroplasten* wird die F_{max}/2 schon ab 0,534 Sekunden erreicht. Die strukturelle Veränderung des Photosyntheseapparates im Bereich des Photosystem II als auch die große Abnahme an ATP-Synthase-Komplexen in den Thylakoidmembranen der *CO₂-Pflanzen* von JWB äußert sich in einer Veränderung der Kinetik der Fluoreszenzinduktionskurve dunkeladaptierter *CO₂-Chloroplasten*.

Die Abbildung 3.24 C zeigt die maximale Fluoreszenz F_m der Kontroll- & CO₂-Chloroplasten von JWB. Die CO₂-Chloroplasten zeigen gegenüber den Kontroll-Chloroplasten eine deutlich höheren F_m-Wert. Dies entspricht dem Ergebnis der mit DCMU behandelten Blätter der Kontroll- & CO₂-Blätter JWB in Abbildung 3.23 B.

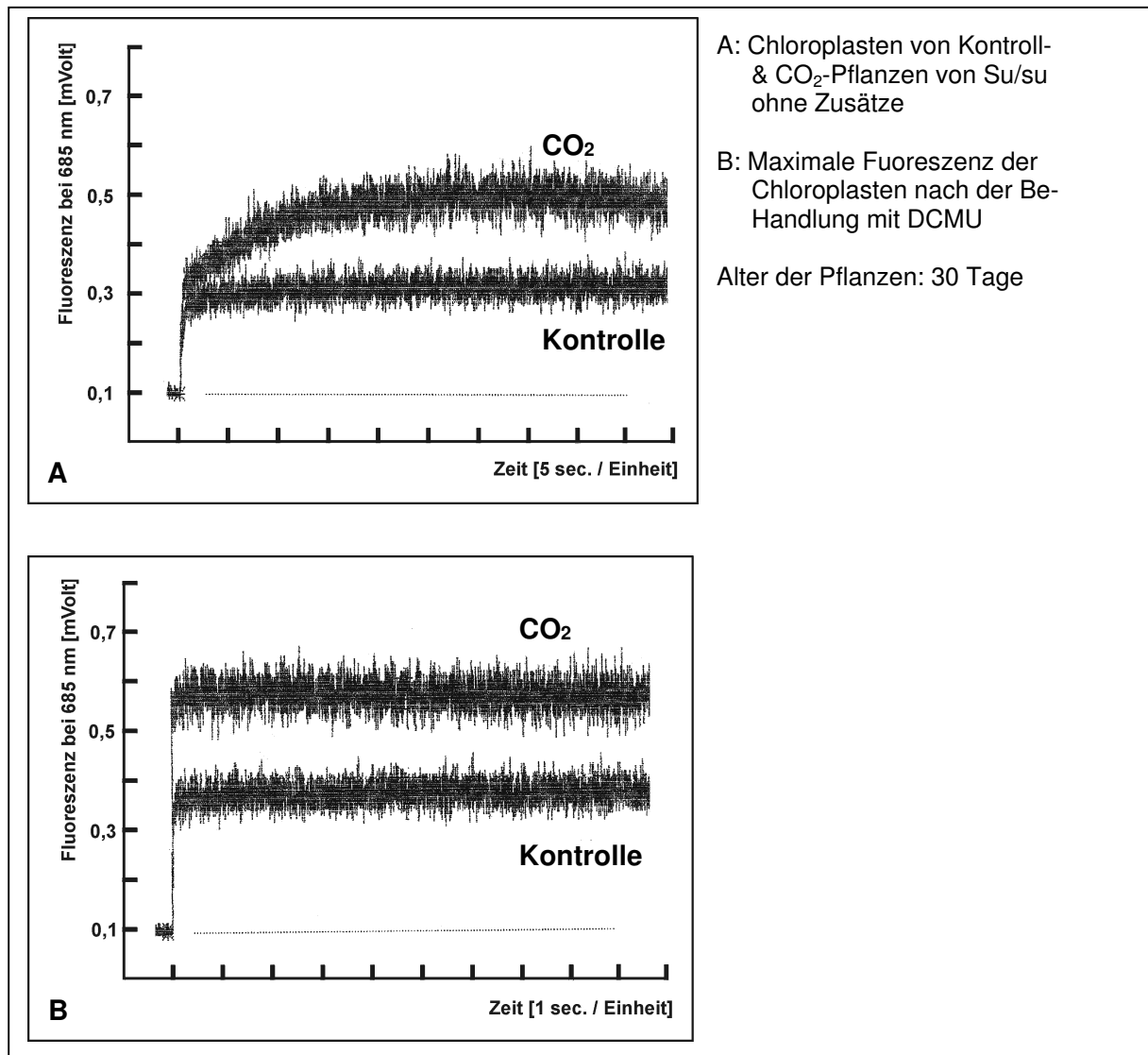
Abbildung 3.25 Fluoreszenzkinetik (685 nm) von dunkeladaptierten Blättern von *Nicotiana tabacum* Aureamutante Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) & erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm).



Die Abbildung 3.25 A zeigt die Kinetik der Fluoreszenzinduktionskurven dunkeladaptierter Blätter der chlorophyllarmen Tabakmutante Su/su, angezogen unter natürlicher (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm). Gegenüber dem Wildtyp JWB (Abb. 3.24 A, Kontrollblatt) zeigen die Blätter der Tabakmutante Su/su keine ausgeprägte „Kautsky-Kurve“. Die Induktionskurve der Su/su-Blätter (siehe Abb.: 3.25 A, Kontrollblatt) verläuft sehr flach. Dies beruht bei der Tabakmutante Su/su auf der hohen Effizienz der Photosynthese. Denn eine hohe Emission von Fluoreszenz bedeutet, daß ein Teil der über das Lichtsammelsystem des Photosyntheseapparates aufgenommenen Lichtenergie nicht über die beiden Photosysteme (I & II) photochemisch umgesetzt wird. Nach dem sehr schnellem Anstieg zur Grundfluoreszenz Fo steigt die Kurve nur sehr flach an. Häufig ist es sehr schwierig in der Kinetik der Fluoreszenzinduktionskurve der dunkeladaptierten Blätter der Tabakmutante

Su/su die kurzfristige maximale Fluoreszenz F_p überhaupt zu erkennen. Die Kinetik der Fluoreszenzinduktionskurve eines dunkeladaptiertem CO_2 -Blattes zeigt dagegen einen deutlich ausgeprägten „Kautsky-Effekt“ (siehe Abb. 3.25 A). Diese Veränderung in der Kinetik der Fluoreszenzinduktionskurve der dunkeladaptierten CO_2 -Blätter von Su/su wird durch die strukturelle Veränderung des Photosynthesapparates hervorgerufen. Diese beruht auf der Zunahme der LHC (I & II)-Polypeptide bei gleichzeitiger Reduktion der Kern (Core)-Komplexe von Photosystem I & II im Photosyntheseapparat der CO_2 -Pflanzen von Su/su. Die Abbildung 3.25 B zeigt die maximale Fluoreszenz F_m der Kontroll- & CO_2 -Blätter, die durch die Behandlung der Blätter mit DCMU induziert wird. Die F_m der CO_2 -Blätter liegt erheblich über der F_m der Kontrollblätter von Su/su. Die starke Zunahme der maximalen Fluoreszenz F_m der CO_2 -Blätter gegenüber den Kontrollen ist eine Konsequenz aus der Verschiebung des Verhältnisses der Kern (Core)-Komplexe der Photosysteme I & II zu LHC (I & II) in Richtung LHC (I & II). Denn der Plastochinongehalt hat in den Thylakoidmembranen der CO_2 -Pflanzen gegenüber den Kontrollpflanzen keine Veränderung erfahren und kann daher nicht für die große Zunahme der maximalen Fluoreszenz bei den Blättern der CO_2 -Pflanzen von Su/su verantwortlich sein (siehe Tabelle 3.11 auf Seite 87).

Abbildung 3.26 Fluoreszenzkinetik (685 nm) von Chloroplasten von *Nicotiana tabacum* Aureamutante Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm).



Die Abbildung 3.26 A zeigt die Kinetik der Fluoreszenzinduktionskurve dunkeladaptierter Chloroplasten der Kontroll- & CO₂-Pflanzen von Su/su. Während die Kinetik der Fluoreszenz der Kontroll-Chloroplasten nach Beginn der Belichtung sehr schnell zur maximalen Fluoreszenz ansteigt, zeigen die *CO₂-Chloroplasten* eine deutlich ausgeprägtere Kinetik. Zudem liegt die maximale physiologische Fluoreszenz der *CO₂-Chloroplasten* signifikant über derjenigen der Kontrollpräparationen, wie Abb. 3.26 A zeigt. Die Kinetik der Fluoreszenzinduktionskurve der isolierten Chloroplasten aus den *CO₂-Pflanzen* von Su/su nähert sich der des Wildtyps JWB an. Die Gründe für diese Veränderung in der Kinetik der Fluoreszenzinduktionskurve der *CO₂-Chloroplasten* liegen, wie schon bereits beschrieben, in der strukturellen Umgestaltung des Photosyntheseapparates. Die Abbildung 3.26 B zeigt die maximale Fluoreszenz der isolierten Chloroplasten aus den Kontroll- & CO₂-Pflanzen von Su/su. Die durch die Inkubation der isolierten Chloroplasten mit DCMU erhaltene maximale

Fluoreszenz F_m der CO_2 -Chloroplasten liegt deutlich über derjenigen der Kontroll-Chloroplasten und entspricht dem Ergebnis der mit DCMU behandelten Blätter der Kontroll- & CO_2 -Blätter in Abbildung 3.25 B.

Die beobachtbaren Veränderungen in der Fluoreszenzkinetik (685 nm) von dunkeladaptierten Blätter und Chloroplasten der CO_2 -Pflanzen von JWB und Su/su sind eine Konsequenz der jeweiligen Anpassung des Photosyntheseapparates von JWB und Su/su an eine erhöhte CO_2 -Atmosphäre (700 ppm).

3.10 Photosynthetische Aktivität

In der vorliegenden Arbeit wurde auch die photosynthetische Aktivität von Blattstücken, Chloroplasten, PS II-Membranen und PS I-Komplexen der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su und ihrer CO_2 -Pflanzen gemessen. Die photosynthetische Aktivität der verschiedenen Präparationen wurde über den Sauerstoffgaswechsel bestimmt. Dieser kann einmal mit der Warburg-Manometrie als auch in der Clark-Sauerstoff-Elektrode gemessen werden. Die Aktivität des Photosystems I (in Chloroplasten und den isolierten Komplexen) wurde in der Clark-Sauerstoff-Elektrode und mit der *P700*-Blitzlichtabsorptionsspektroskopie bestimmt. Bei der *P700*-Blitzlichtabsorptionsspektroskopie wird die Absorptionsänderung des Reaktionspigmentes (*P700*, Chlorophyll a-Molekül) von PS I während der Belichtung der verschiedenen Präparationen mit kurzen Lichtblitzen gemessen.

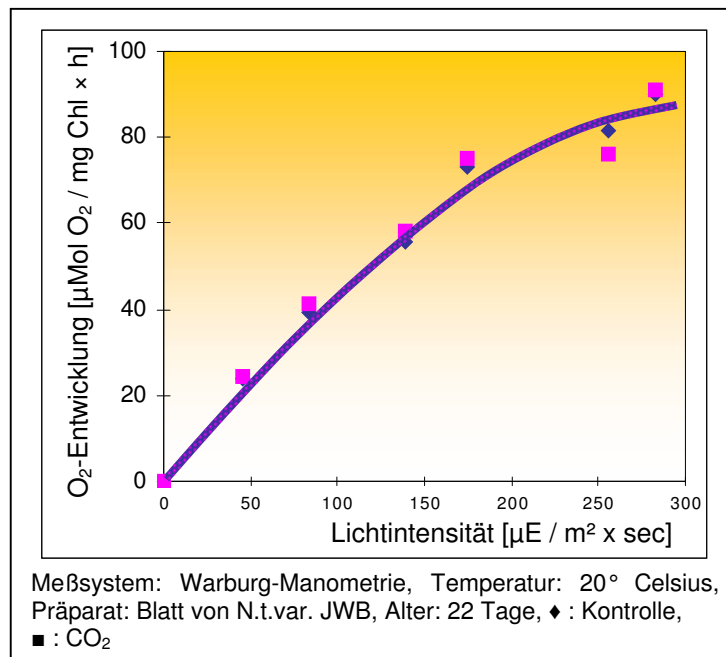
3.10.1 Messung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung von Blattstücken mit der Warburg-Manometrie.

Die photosynthetische Sauerstoffentwicklung von Blattstücken wurde mit der Warburg-Manometrie-Technik bestimmt. Bei der Messung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung wird unter einer konstanten CO_2 -Konzentration von 4500 ppm (erreicht durch ein Carbonat/Bicarbonat-Puffersystem) die gesamte Aktivität des Photosyntheseapparates gemessen. Da die Blattstücke eigentlich intakt sind, - die Blattstücke sind an vier Seiten beschnitten, wird die Aktivität (in diesem Fall die photosynthetische Sauerstoffentwicklung) der Lichtreaktionen der Photosynthese durch die angeschlossene „Dunkelreaktion“ der Photosynthese, also durch den Calvin-Zyklus mit beeinflusst. Obschon der CO_2 -Gehalt in den Warburggefäßen mit 0,45 % sehr hoch liegt und die Aktivität des Enzyms Rubisco in Abhängigkeit von CO_2 gesättigt ist und wohl vollständig zur Carboxylierungsreaktion verschoben ist, können grundsätzliche *Source/Sink-Balance-Regulierungen* die photosynthetische Lichtreaktion (photosynthetische Sauerstoffentwicklung) der Photosyn-

these in ganzen Blättern beeinflussen. Bei der Messung der photosynthetischen Aktivität (Sauerstoffentwicklung oder -aufnahme) von isolierten Chloroplasten, PS II-Membranen und von PS I-Komplexen mit der Clark-Sauerstoff-Elektrode wird die Lichtreaktion der Photosynthese mit der Hilfe von Elektronen-Donatoren und -Akzeptoren gemessen. Hier wird letztendlich die maximale Leistung der photosynthetischen Lichtreaktion, abgekoppelt von den limitierenden Folgereaktionen, gemessen.

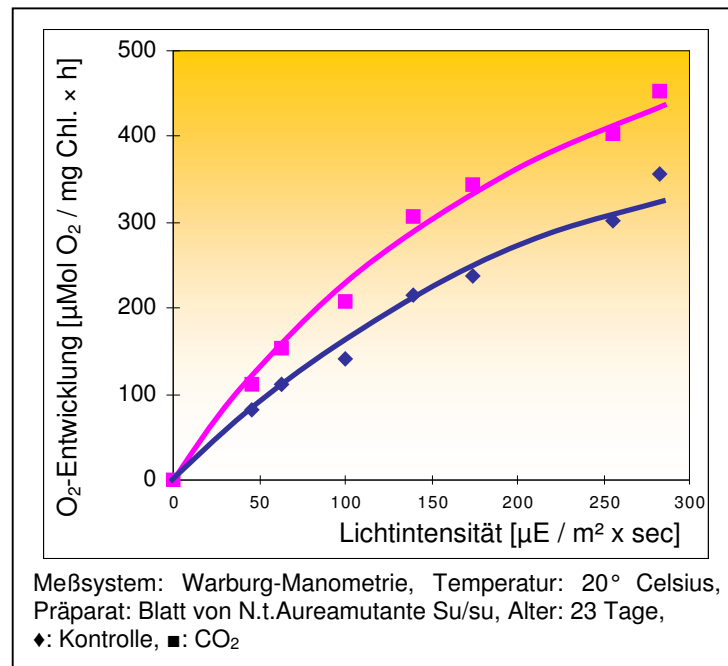
Die folgenden Abbildungen (Abb. 3.27 & 3.28) zeigen die Ergebnisse der Messung der photosynthetischen Aktivität von Blattstücken der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su und ihrer CO_2 -Pflanzen. Die photosynthetische Sauerstoffentwicklung ist auf mg Chlorophyll mal Stunde bezogen. Die Lichtintensität (rotes Licht) variierte von „kein Licht“ bis etwas unter $300 \mu\text{Einstein} / \text{m}^2 \times \text{sec}$. ($\mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$). Für die photosynthetische Aktivitätsmessung wurde jeweils das dritte Blatt ausgehend von den Spitzenmeristemen, welches nicht von anderen Blättern beschattet wurde, eingesetzt. Die Messung wurden jeweils in drei parallelen Ansätzen durchgeführt.

Abbildung 3.27 Messung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung von Blattstücken von *Nicotiana tabacum* var. JWB, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO_2 -Konzentration (700 ppm), mit der Warburg-Manometrie.



In der Abb. 3.27 ist die photosynthetische Sauerstoffentwicklung von Blättern der Tabakpflanze *Nicotiana tabacum* var. *John William's Broadleaf* (JWB) und deren CO_2 -Pflanzen in Abhängigkeit von der Lichtintensität vergleichend dargestellt. Es sind keine Unterschiede in der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung zwischen den Blättern der Kontroll- & CO_2 -Planzen von JWB erkennbar, wenn man feststellt, dass nur der lichtabhängige Teil der Lichtintensitätskurve dargestellt ist.

Abbildung 3.28 Messung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung von Blattstücken der N.t. Aureamutante Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm).



Die Abb. 3.28 zeigt die photosynthetische Sauerstoffentwicklung von Blättern der Tabakmutante Su/su und ihrer CO₂-Pflanzen. Bei der chlorophyllarmen Mutante Su/su hat die Anzucht der Pflanzen in einer zweifach erhöhten CO₂-Atmosphäre von 700 ppm eine deutliche Auswirkung auf die photosynthetische Sauerstoffentwicklung der Blätter. Die Nettoaktivität der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung der CO₂-Blätter erreicht erheblich höhere Werte als die der Kontroll-Blätter. Die größte prozentuale Differenz in der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung der Blätter zwischen den Kontroll- & CO₂-Pflanzen von Su/su findet man bei Beleuchtungsstärken zwischen 80 bis 200 $\mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$. In diesem Bereich erreichen die CO₂-Blätter um über 40 % höhere Sauerstoffentwicklungsraten als die Kontroll-Blätter. Bei voller Ausleuchtung der Warburggefäße (282 $\mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$) liegen die Sauerstoffentwicklungsraten der CO₂-Blätter gegenüber den Kontrollansätzen nur noch um 30 % höher.

Die Blätter der CO₂-Pflanzen von Su/su zeigen also in der Warburg-Manometrie innerhalb der vorgegebenen Lichtintensität (bis 300 $\mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$) deutlich höhere Sauerstoffentwicklungsraten als die der Kontroll-Pflanzen von Su/su. Dieser Anstieg in der photosynthetischen Aktivität der CO₂-Blätter von Su/su ist eine Konsequenz aus Umgestaltung des Photosyntheseapparates. Die Zunahme des LHC (I & II) bei gleichzeitiger Reduktion der Core-Komplexe der beiden Photosysteme (I & II) in den Thylakoidmembranen der CO₂-Pflanzen führt gegenüber den Kontrollanzuchten von Su/su zu einer besseren Quantenversorgung der Reaktionszentren von PS I & II. Das heißt, die Quantenausbeute der Photosynthese ist verbessert.

3.10.2 Messung der photosynthetischen Aktivität von Chloroplasten in der Clark-Sauerstoff-Elektrode.

Zur Messung der photosynthetischen Aktivität von Chloroplasten eignet sich die Clark-Sauerstoff-Elektrode. Durch Zusätze von Elektronendonatoren und -akzeptoren sowie von Inhibitoren kann man die Lichtreaktion der Photosynthese in ihre Teilkomponenten aufteilen und analysieren (siehe Abb.: Z-Schema des photosynthetischen Elektronentransportes mit... auf Seite 48). Die Lichtintensität der Standardbeleuchtung beträgt $1511 \mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$. Die Temperatur im Reaktionsgefäß der Clark-Sauerstoff-Elektrode war 20° Celsius. Die folgende Tabelle gibt den Vergleich der photosynthetischen Aktivitäten isolierter Chloroplasten der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su und ihrer CO_2 -Pflanzen wieder. Das Alter der Pflanzen zum Zeitpunkt der Isolierung der Chloroplasten betrug beim Wildtyp JWB bis zu 30 und bei der chlorophyllarmen Mutante Su/Su bis zu 40 Wachstumstagen. Die Aktivität der verschiedenen Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports in isolierten Chloroplasten wurde unter gekoppelter und entkoppelter Bedingung gemessen. Damit ist die Photophosphorylierung gemeint. Unter gekoppelter Bedingung wird die Aktivität des photosynthetischen Elektronentransports in isolierten Chloroplasten bei gleichzeitiger Synthese von ATP durch den ATP-Synthase-Komplex gemessen. Die Energie zur Synthese von ATP stammt aus dem elektrochemischen Protonengradient, der sich während des lichtbetriebenen Elektronenflusses zwischen dem Intrathylakoidraum und dem Stroma bildet. Die Entkopplung der Photophosphorylierung von der Aktivität des photosynthetischen Elektronentransports geschieht durch Behandlung der isolierten Chloroplasten mit Ammoniumsulfat $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$. Dies führt zu einer deutlichen Stimulierung der Aktivität des photosynthetischen Elektronentransports in isolierten Chloroplasten.

Tabelle 3.13 Vergleich der Aktivität von verschiedenen Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports in isolierten Chloroplasten von *Nicotiana tabacum* var. JWB & der Aureamutante Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm).

Elektronentransport Reaktion	Aktivität [$\mu\text{Mol O}_2 / \text{mg Chl.} \times \text{h}$]			
	JWB Chloroplasten		Su/su Chloroplasten	
	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂
<u>H₂O → FeCy</u>				
gekoppelt	105,93 ± 29,9	84,32 ± 21,1	166,94 ± 51,5	203,23 ± 57,7
entkoppelt	133,47	137,44	201,99	248,97
<u>H₂O → MV</u>				
gekoppelt	61,38 ± 16,1	39,04 ± 13,2	126,18 ± 35,7	92,63 ± 21,6
entkoppelt	76,72	57,77	156,46	127,83
<u>Ascorbat/DCPIP → MV in Gegenwart von DCMU</u>				
gekoppelt	299,5 ± 126,34	199,03 ± 70,19	809,47 ± 413,71	454,61 ± 209,43
entkoppelt	371,38	284,61	1011,84	663,73

Meßbedingungen: Clark-Sauerstoff-Elektrode, Lichtintensität der Standardbeleuchtung: 1511 $\mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$, Temperatur: 20° Celsius, FeCy: Kaliumhexacyanoferrat (III) ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), MV: Methylviologen, DCPIP: Dichlorphenolindophenol, DCMU: (3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff, \pm Wert = Standardabweichung

Tabelle 3.14 Prozentuale Stimulierung der verschiedenen Teilreaktionen des Elektronentransports unter Einschluß der Lichtreaktionen I & II durch Entkopplung des photosynthetischen Elektronentransports von der Photophosphorylierung isolierter Chloroplasten von *Nicotiana tabacum* var JWB & der Aureamutante Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm).

Prozentuale Stimulierung der photosynthetischen Aktivität durch Entkopplung des photosynthetischen Elektronentransports von der Photophosphorylierung

Elektronentransport Reaktion	JWB Chloroplasten		Su/su Chloroplasten	
	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂
H ₂ O → FeCy	26 %	63 %	21 %	23 %
H ₂ O → MV	25 %	48 %	24 %	38 %
Ascorbat/DCPIP → MV in Gegenwart von DCMU	24 %	43 %	25 %	46 %

Meßbedingungen: Clark-Sauerstoff-Elektrode, Lichtintensität der Standardbeleuchtung: 1511 $\mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$, Temperatur: 20° Celsius, FeCy: Kaliumhexacyanoferrat (III) ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), MV: Methylviologen, DCPIP: Dichlorphenolindophenol, DCMU: (3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff

In Tabelle 3.13 sind die Mittelwerte der einzelnen Teilreaktionen der Photosynthese isolierter Chloroplasten der beiden Tabakpflanzen und ihrer *CO₂-Pflanzen* unter gekoppelter (funktionsfähige Chloroplasten-ATP-Synthasen) und entkoppelter Bedingung dargestellt. Die nach dem \pm Zeichen dargestellten Zahlenwerte geben einerseits die übers Jahr auftretenden Standardabweichungen als auch die innerhalb der Entwicklung der Pflanzen bedingten Schwankungen wieder. Dabei nehmen die entwicklungsbedingten Schwankungen der Aktivität der einzelnen Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports den größten Anteil ein.

Bei der Wildform JWB zeigt der Vergleich der photosynthetischen Aktivität isolierter Chloroplasten zwischen den Kontroll- & *CO₂-Pflanzen* im Gegensatz zum Vergleich der photosynthetischen Aktivität von Blattstücken (gemessen mit der Warburg-Manometrie) deutliche Unterschiede auf. So ist im Mittel die Aktivität der PS II-Reaktion $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$ isolierter Chloroplasten aus den *CO₂-Pflanzen* von JWB unter gekoppelter Bedingung gegenüber den Kontrollpräparationen deutlich kleiner (- 20 %). Auch die Aktivität der photosynthetischen Gesamtelektronentransportkette $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$ (über die beiden Photosysteme II & I) und der PS I-Reaktion $\text{Ascorbat/DCPIP} \rightarrow \text{MV}$ der isolierten Chloroplasten aus den JWB *CO₂-Pflanzen* liegen unter gekoppelter Bedingung bezogen auf „mg Chlorophyll und Stunde“ ebenfalls klar unter denen der Kontrollansätze (- 36 % & - 33 %). Die Entkopplung der Photophosphorylierung von der Lichtreaktion der Photosynthese durch Zugabe von Ammoniumsulfat erhöht erwartungsgemäß die Aktivität der einzelnen Teilstücke des photosynthetischen Elektronentransports. Während nach der Entkopplung der Photophosphorylierung vom photosynthetischen Elektronentransport die Aktivitäten der Gesamtelektronentransportkette $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$ und der PS I-Reaktion $\text{Ascorbat/DCPIP} \rightarrow \text{MV}$ der *CO₂-Chloroplasten* von JWB im Mittel gegenüber den Kontrollpräparationen immer noch kleiner ausfallen (- 24 % & - 23 %), erreicht die PS II-Reaktion $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$ der *CO₂-Chloroplasten* leicht höhere Werte (3 %).

Die Tabelle 3.14 zeigt die prozentuale Stimulierung der verschiedenen Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports durch Entkopplung des photosynthetischen Elektronentransports von der Photophosphorylierung. Die durchschnittliche prozentuale Stimulierung der verschiedenen Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports liegt bei den Chloroplastenpräparationen der Kontroll-Pflanzen von JWB bei 25 %. Dagegen zeigen die *CO₂-Chloroplasten* von JWB in der Clark-Sauerstoff-Elektrode eine erheblich größere prozentuale Stimulierung der verschiedenen Teilreaktionen. Zudem zeigt die Tabelle 3.14 bei den *CO₂-Chloroplasten* Unterschiede im Grad der Stimulierung der einzelnen Teilreaktionen der Lichtreaktion der Photosynthese durch Entkopplung des photosynthetischen Elektronentransports von der Photophosphorylierung. Während bei den *CO₂-Chloroplasten* die PS II-Aktivität $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$ eine durchschnittliche Stimulierungsrate von über 60 % aufweist, wird dagegen die PS I-Aktivität $\text{Ascorbat/DCPIP} \rightarrow \text{MV}$ nur um 43 %

stimuliert. Die Entkopplung der Gesamtelektronenkette $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$ von der Photophosphorylierung führt zu einer Steigerung der Aktivität um 48 %.

Die Ursache für die stärkere Stimulierung der verschiedenen Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports bei den *CO₂-Chloroplasten* gegenüber den Kontrollen liegt in der starken Verringerung der Menge an ATP-Synthase-Komplexen in den Thylakoidmembranen der *CO₂-Chloroplasten* von JWB. Denn eine Reduktion der ATP-Synthase-Komplexe führt zu einem erheblich verringertem Protonenfluß vom Intrathylakoidraum zum Stroma. Dies bedeutet, dass der elektrochemische Protonengradient zwischen dem Intrathylakoidraum und dem Stroma bei den *CO₂-Chloroplasten* gegenüber den Kontrollen von JWB während der Belichtung stärker ansteigt, da im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanzen* pro Zeiteinheit weniger Protonen vom Intrathylakoidraum über die ATP-Synthase-Komplexe zum Stroma fließen können. Die deutlich höhere Stimulierung der PS II-Reaktion $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$ gegenüber den beiden anderen Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports bei den *CO₂-Chloroplasten* von JWB beruht auf der größeren Reduktion in der Anzahl der ATP-Synthase-Komplexe in diesem Bereich des Photosyntheseapparates. D.h., dass im Bereich vom Photosystem II (PS II) im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanzen* von JWB die Zahl der ATP-Synthase-Komplexe kleiner ist als in den anderen Bereichen des Photosyntheseapparates.

Nach der Entkopplung des photosynthetischen Elektronentransports von der Photophosphorylierung erreicht die Aktivität der PS II-Reaktion $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$ in den *CO₂-Chloroplasten* das Niveau der Kontroll-Chloroplasten. Die im Mittel kleineren PS II-Raten der *CO₂-Chloroplasten* (gemessen unter gekoppelter Bedingung) gegenüber den Kontrollen sind also eine Konsequenz der starken Abnahme der ATP-Synthase-Komplexe in der Thylakoidmembran der *CO₂-Chloroplasten*. Bei den beiden anderen Teilreaktion des photosynthetischen Elektronentransports führt die Entkopplung von der Photophosphorylierung in den *CO₂-Chloroplasten* gegenüber den Kontrollpräparationen zu einer größeren Stimulierung der jeweiligen Reaktion ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$, Ascorbat/DCPIP $\rightarrow \text{MV}$), dennoch bleiben die Raten deutlich unter denen der Kontrollen (siehe Tabelle 3.13 auf Seite 123). Die niedrigere Aktivität der Gesamtelektronenkette $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$ und der PS I-Reaktion Ascorbat/DCPIP $\rightarrow \text{MV}$ bei den *CO₂-Chloroplasten* von JWB beruht einerseits auf der stärkeren Kopplung des photosynthetischen Elektronentransports mit der ATP-Synthase und andererseits in der strukturellen Veränderung des Photosyntheseapparates.

Bei der chlorophyllarmen Mutante Su/su zeigen die *CO₂-Chloroplasten* bezogen auf „mg Chlorophyll und Stunde“ unter gekoppelter Bedingung bei einer Beleuchtungsintensität von $1511 \mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$ im Mittel um über 20 % höhere PS II-Raten in der Reaktion $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$ als die Kontrollansätze (siehe Tabelle 3.13 auf Seite 123). Die Aktivität der photosynthetischen Gesamtelektronenkette $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$ liegt jedoch im Mittel deutlich unter denen der Kontrollansätze (- 26 %). Auch die PS I-Raten in der Reaktion Ascorbat/DCPIP $\rightarrow \text{MV}$ erreichen bei den *CO₂-Chloroplasten* gegenüber den Kontrollen erheblich niedrigere Werte (- 43 %). Wird die Photophosphorylierung von der Lichtreaktion abgekoppelt, so steigt

die photosynthetische Aktivität der drei Reaktionstypen $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$, $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$ & Ascorbat/DCPIP $\rightarrow \text{MV}$ bei den beiden Chloroplastentypen (Kontroll- & CO_2 -Chloroplasten) an. Der Trend bleibt jedoch bestehen. Die Raten der PS II-Reaktion der *CO₂-Chloroplasten* erreichen unter entkoppelter Bedingung ebenfalls deutlich höherer Werte. Die Aktivität der photosynthetischen Gesamtelektronenkette und der PS I-Reaktion in den *CO₂-Chloroplasten* von Su/su bleiben auch unter endkoppelter Bedingung klar unter denen der Kontrollansätze (siehe Tabelle 3.13 auf Seite 123).

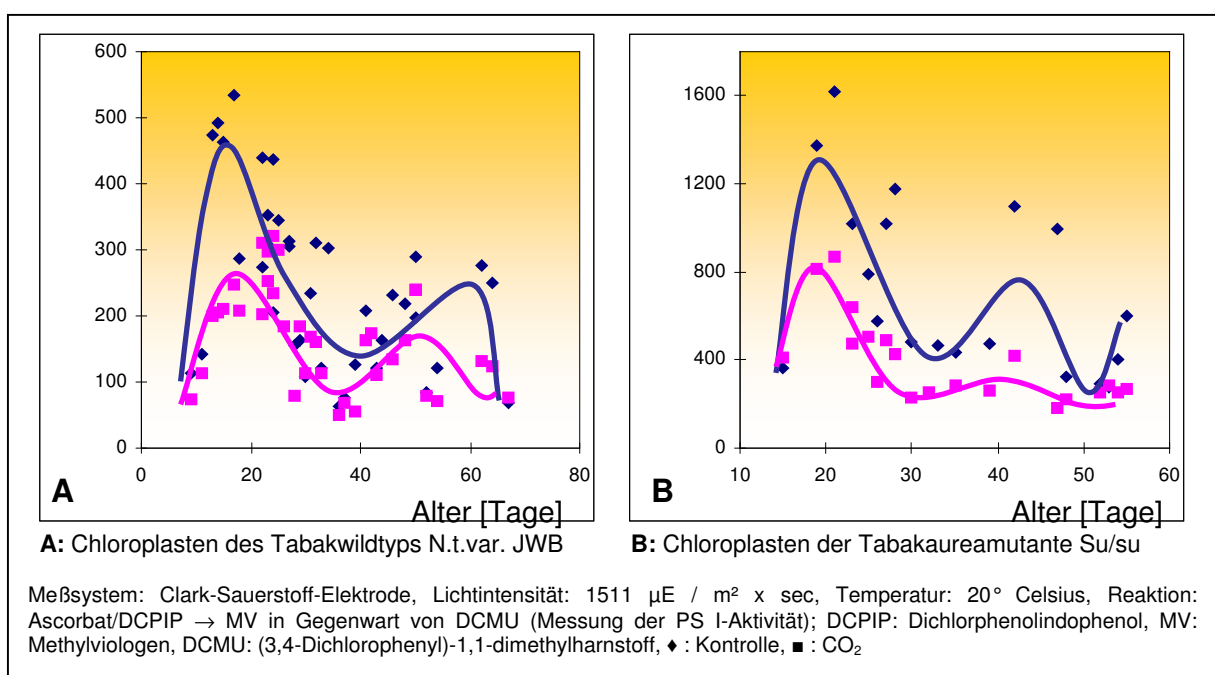
Die biochemischen Untersuchungen zeigen auf, dass im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanzen* von Su/su der LHC (I & II) zugenommen hat, während der Anteil der Core-Komplexe der beiden Photosysteme I & II im Photosyntheseapparat gegenüber der Kontrollanzucht beträchtlich kleiner ausfällt. Die Aktivität der PS II-Reaktion $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$ fällt im Mittel bei den *CO₂-Chloroplasten* gegenüber den Kontrollpräparationen deutlich höher aus, während die Aktivität der PS I-Reaktion Ascorbat/DCPIP $\rightarrow \text{MV}$ erheblich kleiner ausfällt. Diese Beobachtung führt zu dem Schluß, dass der LHC (I & II) im Bereich des Photosystem I (PS I) stärker zugenommen hat als im Bereich des Photosystem II (PS II). Denn die Aktivität der beiden Teilreaktionen (PS II- & PS I-Reaktion) des photosynthetischen Elektronentransports wird ja auf mg Chlorophyll und Stunde bezogen. D.h., dass bei einer Beleuchtungsstärke von $1511 \mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$ die PS II-Reaktion $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$ der *CO₂-Chloroplasten* von Su/su noch nicht im lichtgesättigten Bereich oder sich im Übergangsbereich zur Lichtsättigung befindet. Die Zunahme an LHC II im PS II verbessert bei den *CO₂-Chloroplasten* gegenüber den Kontrollpräparationen von Su/su die Quantenversorgung vom PS II. Dies kann in der Clark-Sauerstoff-Elektrode gegenüber den Kontrollchloroplasten zu einer Steigerung der PS II-Aktivität führen. Die PS I-Reaktion Ascorbat/DCPIP $\rightarrow \text{MV}$ der *CO₂-Chloroplasten* ist dagegen schon längst lichtgesättigt. Unter der gegebenen Lichtintensität von $1511 \mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$ kann die Zunahme an LHC im PS I die PS I-Aktivität bezogen auf mg Chlorophyll und Stunde bei den *CO₂-Chloroplasten* von Su/su nicht mehr stimulieren. Im Gegenteil, - die PS I-Aktivität der *CO₂-Chloroplasten* muß bezogen auf Chlorophyll gegenüber den Kontrollansätzen niedriger ausfallen, da der Anteil an PS I-Reaktionszentren (psaA/B Genprodukt, auch CP1 genannt) in den Thylakoidmembranen der *CO₂-Pflanzen* bezogen auf Chlorophyll kleiner ist als in den Kontrollansätzen.

Die Tabelle 3.14 zeigt die prozentuale Stimulierung der drei Teilreaktionen durch Entkopplung der ATP-Synthese vom photosynthetischem Elektronentransport. Im Durchschnitt werden die drei Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports bei den Chloroplasten der Kontrollpflanzen von Su/su um 23 % stimuliert. Damit entspricht die prozentuale Stimulierung der drei Teilreaktionen in den Chloroplasten der Kontrollanzuchten von Su/su denen des Wildtyps JWB (Kontrollpflanzen). Bei den *CO₂-Chloroplasten* von Su/su wird die Aktivität der Gesamtelektronentransportkette $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$ und der PS I-Reaktion Ascorbat/DCPIP $\rightarrow \text{MV}$ durch die Entkopplung des photosynthetischem Elektronentransports von der Photophosphorylierung gegenüber den Kontrollen deutlich stärker stimuliert. Dagegen fällt die Stimulierung der PS II-Reaktion $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$ bei den *CO₂-Chloroplasten* im Vergleich zu den Kontrollpräparationen gleichhoch aus. Die stärkere

Stimmulierung der Aktivität der Gesamtelektronentransportkette $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$ und der PS I-Reaktion $\text{Ascorbat/DCPIP} \rightarrow \text{MV}$ bei den CO_2 -Chloroplasten beruht auf der stärkeren Kopplung der Photophosphorylierung mit dem photosynthetischen Elektronentransport. Denn die Anzahl der ATP-Synthase-Komplexe ist im Photosyntheseapparat der CO_2 -Pflanzen von Su/su kleiner. Im Bereich des Photosystem II scheint der Anteil der ATP-Synthase-Komplexe im Photosyntheseapparat der CO_2 -Pflanzen gegenüber den Kontrollpflanzen unverändert zu sein, da die Stimulierung der PS II-Reaktion $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$ bei den CO_2 -Chloroplasten gegenüber den Kontrollpräparationen durch die Entkopplung der ATP-Synthase vom photosynthetischen Elektronentransport in etwa gleich ist.

Die in der Tabelle 3.13 aufgeführten Raten der drei Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports der beiden Tabakpflanzen (JWB & Su/su) sind Mittelwerte. Da die photosynthetische Aktivität der isolierten Chloroplasten übers Jahr verteilt aufgenommen wurde, spiegeln die Standardabweichungen der einzelnen Meßwerte zum Teil die jahreszeitlichen Schwankungen wieder. Andererseits zeigen die beiden Tabakpflanzen entwicklungsbedingten Schwankungen in der photosynthetischen Aktivität der Chloroplasten. Dies gilt vor allem für die PS I-Aktivität. Hier gibt es Standardabweichungen, die im Mittel um 43,5 % vom jeweiligem Meßwert abweichen. Die Abbildung 3.29 zeigt die Schwankungen in der PS I-Aktivität $\text{Ascorbat/DCPIP} \rightarrow \text{MV}$ isolierter Chloroplasten, gemessen in der Clark-Sauerstoff-Elektrode, im Bezug auf das Alter der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su und ihrer CO_2 -Pflanzen.

Abbildung 3.29 Photosystem I-Aktivität isolierter Chloroplasten im Bezug auf das Alter von *Nicotiana tabacum* var. JWB & der Aureamutante Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO_2 -Konzentration (700 ppm).



Bei der Tabakwildform JWB erreichen die Kontroll-Chloroplasten ab der zweiten bis Anfang der dritten Wachstumswoche die höchsten PS I-Aktivitäten (siehe Abb. 3.29 A). Danach fallen die PS I-Aktivitäten der Kontroll-Chloroplasten deutlich ab. Bei den *CO₂-Chloroplasten* fällt die PS I-Aktivität, wie schon beschrieben, grundsätzlich kleiner aus. Sie zeigen aber ebenfalls zwischen Ende der zweiten und zu Beginn der dritten Wachstumswoche die höchsten PS I-Raten auf.

Einen ähnlichen Kurvenverlauf nehmen auch die PS I-Raten isolierter Chloroplasten der chlorophyllarmen Mutante Su/su (Kontrollanzucht), wie Abb 3.29 B zeigt. Innerhalb der dritten Wachstumswoche zeigen sie die größten PS I-Aktivitäten. Danach fallen die PS I-Raten beträchtlich niedriger aus. Die *CO₂-Chloroplasten* von Su/su zeigen einen ähnlichen Kurvenverlauf bezogen auf das Alter. Auch in diesem Fall liegen die PS I-Aktivitäten der *CO₂-Chloroplasten* deutlich unter denen der Kontrollansätze.

Aufgrund der hohen Schwankungen der PS I-Aktivität, bezogen auf das Alter der isolierten Chloroplasten, müssen die Standardabweichungen von den Mittelwerten der PS I-Raten größer ausfallen. Doch trotz der hohen Standardabweichungen in den PS-Aktivitäten, dies verdeutlicht auch die Abbildung 3.29, zeigen die *CO₂-Chloroplasten* der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su in der Clark-Sauerstoff-Elektrode deutlich niedrigere PS I-Raten als die entsprechenden *Kontroll-Chloroplasten*.

3.10.3 Messung des P700-Signals von Chloroplasten durch die P700-Blitzlichtabsorptionsspektroskopie

Zusätzlich zum unter 3.10.2 dargestellten Vergleich der PS I-Aktivität isolierter Chloroplasten der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su und ihrer *CO₂-Pflanzen* ist es auch möglich, die Absorptionsänderung des Chlorophyll a – Moleküls im Reaktionszentrum (P700, psaA/B-Genprodukt, CP1) von PS I in den verschiedenen Chloroplastenpräparationen zu vergleichen. Die Absorptionsänderung des Chlorophyll a-Moleküls im Reaktionszentrum vom Photosystem I beruht auf einer Photooxidation, nämlich der Bleichung des Chlorophyll a-Moleküls durch einen Lichtblitz, was sich als Absorptionsabnahme bei 700 nm messen läßt [Marsho und Kok, 1980].

Die Größe der Absorptionsänderung des P700 (Chlorophyll a-Molekül des PS I-Reaktionszentrum) gibt Aufschluß:

- 1) über die Menge an Chlorophyll a (P700) im Reaktionszentrum von PS I in der Chloroplastenpräparation.
- 2) über die Qualität des photosynthetischen Elektronentransports um Photosystem I, wenn dem Meßansatz kein Elektronendonator und kein Elektronenakzeptor hinzugegeben wurde. Die Höhe der Signalamplitude des P700 hängt in diesem Fall von der gesamten

photosynthetischen Elektronentransportkette ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NADP}^+$) ab. Je besser diese funktioniert, umso größer wird das P700-Signal sein.

- 3) über die maximale Leistung der aktiven PS I-Komplexe in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten, wenn dem Meßansatz ein Elektronendonator (Ascorbat/DCPIP) und ein Elektronenakzeptor (Methylviologen) hinzugegeben wird.

Die Chlorophyllkonzentration im Meßansatz (Glasküvette) lag stets bei $10 \mu\text{g}$ Chlorophyll / ml. Dies bedeutet, dass die gemessenen P700-Signale der verschiedenen Chloroplastenpräparationen (*Kontroll- & CO₂-Pflanzen*) der beiden Tabakpflanzen (JWB & Su/su) im Bezug auf Chlorophyll vergleichbar sind.

Besteht man eine chlorophyllhaltige Probe mit dem Licht einer Wellenlänge (in diesem Fall 700 nm), so erhält man ein durch Rauschen überlagertes Absorptionssignal (I_0). Wird nun die chlorophyllhaltige Probe mit kurzen Lichtblitzen bestrahlt, so führt dies zu einer Änderung des Absorptionssignals (dI). Diese Absorptionsänderung (dI/I_0) sind sehr klein und existieren nur für eine extrem kurze Zeit (bis zu 10^{-15} sec.). Zur Messung der P700-Signale (dI/I_0) wird daher die repetitive Blitzlichtanregung verwendet, da dies das Signal / Rausch-Verhältnis erhöht [Rüppel und Witt, 1969].

Tabelle 3.15 Vergleich des P700-Signals isolierter Chloroplasten von N.t. var JWB & der Aureamutante Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm).

Reaktion	$dI / I_0 \times 10^{-4} \times 10\mu\text{g Chl.}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$			
	JWB-Chloroplasten		Su/su-Chloroplasten	
	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂
$\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NADP}^+$	0,69 ± 0,09	0,44 ± 0,06	1,7 ± 0,53	1,12 ± 0,31
Ascorbat/DCPIP → MV in Gegenwart von DCMU	2,34 ± 0,39	2,85 ± 0,49	3,35 ± 0,85	2,42 ± 0,67

Meßsystem: P700-Blitzlichtspektroskopie, NADP⁺: Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, DCPIP: Dichlorphenolindophenol, MV: Methylviologen, DCMU: 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff

Im Mittel liegt die Signalamplitude (dI/I_0) des P700 bei den Chloroplastenpräparationen der Kontrollanzuchten von JWB in Abhängigkeit von der Qualität des photosynthetischen Elektronentransportes (Reaktion: $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NADP}^+$) um $0,69 \times 10^{-4} \times 10\mu\text{g Chl.}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ (dI/I_0), während man bei den Chloroplasten der *CO₂-Pflanzen* von JWB im Durchschnitt P700-Signale um $0,44 \times 10^{-4} \times 10\mu\text{g Chl.}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ (dI/I_0) mißt. Wird die maximale Absorptionsänderung des P700 durch die Zugabe eines Elektronendonors (Ascorbat/DCPIP) und eines Elektronenakzeptors (MV) in den Reaktionsansatz gemessen, so liegt das mittlere P700-Signal der Kontroll-Chloroplasten bei $2,34 \times 10^{-4} \times 10\mu\text{g Chl.}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ (dI/I_0). Bei den *CO₂-*

Chloroplasten von JWB liegt das maximale P700-Signal im Mittel um $2,85 \times 10^{-4} \times 10\mu\text{g Chl.} \times \text{ml}^{-1}$ (dI/I_0).

Die Chloroplastenpräparationen der *CO₂-Pflanzen* von JWB zeigen im Mittel gegenüber den entsprechenden Kontrollansätzen ein erheblich kleineres P700 Signal, wenn die Reaktion von $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NADP}^+$ gemessen wird. Bei dieser Reaktion wird letztlich die Qualität des photosynthetischen Elektronentransports von H_2O über PS II, Plastochinon, Cytochrom *b₆f*, Plastocyanin, PS I nach der Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase gemessen. Das P700-Signal der isolierten Chloroplasten hängt also von der Anzahl der pro Zeiteinheit bereitgestellten Elektronen ab. Natürlich wird das P700-Signal in seiner Amplitude auch von der Abflußrate der Elektronen vom PS I zur Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase mitbestimmt.

Im Durchschnitt zeigen die *CO₂-Chloroplasten* von JWB gegenüber den Kontrollansätzen ein um 36 % niedrigeres P700-Signal, wenn die Reaktion von $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NADP}^+$ gemessen wird. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Ergebnis des Vergleiches der Aktivität der photosynthetischen Elektronentransportkette $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$ Methyviologen isolierter Chloroplasten der Kontroll- & *CO₂-Pflanzen* von JWB, gemessen mit der Clark-Sauerstoff-Elektrode, aus Tabelle 3.13 (Seite 123) überein. Das deutlich niedrigere P700-Signal der *CO₂-Chloroplasten* gegenüber den Kontrollansätzen kann auf eine Störung im photosynthetischen Elektronentransport begründet sein.

Wird das maximale P700-Signal gemessen (Ascorbat/DCPIP \rightarrow MV in Gegenwart von DCMU), so liegt das P700-Signal der *CO₂-Chloroplasten* deutlich über (20 %) dem P700-Signal der Kontrollpräparationen von JWB. Dieser Befund bestätigt in physiologischer Hinsicht die Zunahme der Core-Komplexe von Photosystem I im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanzen* von JWB.

Bei der chlorophyllarmen Tabakmutante Su/su zeigen die Chloroplasten der *Kontrollpflanzen* bei der Reaktion $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NADP}^+$ (photosynthetischer Elektronentransport) im Mittel ein P700-Signal um $1,7 \times 10^{-4} \times 10\mu\text{g Chl.}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ (dI/I_0), während die Chloroplasten der *CO₂-Pflanzen* P700-Signale um $1,12 \times 10^{-4} \times 10\mu\text{g Chl.}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ (dI/I_0) erreichen. Das maximale P700 Signal der Kontroll-Chloroplasten liegt bei $3,35 \times 10^{-4} \times 10\mu\text{g Chl.}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ (dI/I_0), während die *CO₂-Chloroplasten* maximale P700 Signale bei $2,42 \times 10^{-4} \times 10\mu\text{g Chl.}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ (dI/I_0) ergeben.

Die P700-Signale (Reaktion: $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NADP}^+$, Ascorbat/DCPIP \rightarrow MV in Gegenwart von DCMU) der *CO₂-Chloroplasten* von Su/su liegen deutlich unter denen der Kontrollpräparationen. Dieses Ergebnis bestätigt die entsprechende Messungen in der Clark-Sauerstoff-Elektrode (siehe Tabelle 3.13 auf Seite 123). Die Anzucht der Tabakaureamutante Su/su unter erhöhtem CO_2 (700 ppm) führt zu einem Anstieg des Lichtsammelantennensystem (LHC I & II) im Photosyntheseapparat. Gleichzeitig ist der Anteil der Core-Komplexe von Photosystem I & II im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanzen* von Su/su gegenüber den Kontrollen reduziert.

Diese strukturelle Veränderung im Photosyntheseapparat der CO₂-Pflanzen von Su/su ist der Grund für die kleineren P700-Signale gegenüber den Kontrollanzuchten. Denn die P700-Signale werden auf Chlorophyll bezogen.

3.10.4 Photosynthetische Aktivität isolierter PS I-Komplexe

Neben dem Vergleich der photosynthetischen Aktivität und der P700-Signale isolierter Chloroplasten der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su und ihrer CO₂-Pflanzen wurde auch die photosynthetische Aktivität isolierter PS I-Komplexe gemessen. Zur Isolierung der nativen PS I-Komplexe wurde die Methode von Wynn & Malkin (1988) mit leichten Modifizierungen angewandt. Es wurde die Aktivität des lichtbetriebenen Elektronenflusses von Ascorbat/DCPIP über PS I nach Methylviologen (MV) gemessen (Clark-Sauerstoff-Elektrode). Desweiteren wurde das maximale P700-Signal der isolierten PS I-Komplexe unter Beteiligung eines Elektronendonators (DCPIP, durch Ascorbat reduziert) und eines Elektronenakzeptors (MV) durch die P700-Blitzlichtabsorptionsspektroskopie ermittelt. Zusätzlich ist das Verhältnis Chlorophyll zu P700 der isolierten PS I-Komplexe bestimmt worden.

Tabelle: 3.16 Vergleich der P700-Signale und der Aktivität sowie des Verhältnisses Chlorophyll zu P700 (w/w) von PS I-Komplexen aus N.t.var. JWB und der Aureamutante Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm).

	JWB PS I-Komplex		Su/su PS I-Komplex	
	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂	350 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂
P700-Signal: [dI/I ₀ × 10 ⁻⁴ × 10μg Chl. · ⁻¹ × ml ⁻¹]	1,08 ± 0,19	3,02 ± 0,76	4,19 ± 0,92	2,59 ± 0,65
Aktivität: O₂-Aufnahme [μMol O ₂ /mg Chl. × h]	230,83 ± 47,9	582,04* ± 140,5	756,84 ± 148,1	505,68 ± 116,3
Verhältnis: Chlorophyll / P700	90,3 ± 14,8	49,8 ± 9,1	60**	77,5**

* Die Werte wurden bei einer Beleuchtungsintensität von 4930 μE / m² × sec gemessen. ** Einzelmessung, da wegen der geringen Ausbeute an PS I mehrere Präparationen gepoolt wurden. O₂-Aufnahme: Mehlerreaktion DCPIP/Ascorbat → Methylviologen (MV)

Die isolierten PS I-Komplexe aus den *CO₂-Pflanzen* von JWB weisen im Mittel gegenüber den Kontrollpräparationen ein um das 2,8fach höhere P700 Signal (Ascorbat/DCPIP → Methylviologen) auf. In der Clark-Sauerstoff-Elektrode erreichen die PS I-Komplexe der *CO₂-Pflanzen* im Durchschnitt 2,5fach höhere PS I-Raten (Ascorbat/DCPIP → Methylviologen) als die Kontrollen, vorausgesetzt die Lichtintensität war während der Messung der Aktivität sättigend. Die chemische Bestimmung der Anzahl der Chlorophyll-Moleküle pro Reaktionszentrum (i.e. P700) ergibt im Mittel ein Chlorophyll / P700 Verhältnis von 90,3 bei den PS I-Komplexen der Kontrollpflanzen und von 49,8 bei denen der *CO₂-Pflanzen*. Pro mg Chlorophyll steigt also der Anteil der aktiven Reaktionszentren in den *CO₂ PS I-Komplexen* gegenüber den Kontrollen an.

Die chemische Bestimmung des Chlorophyll / P700 Verhältnisses fällt gegenüber der photochemischen Bestimmung (lichtabhängige Messung des P700-Signals unter Zugabe eines Elektronendonators und eines Elektronenakzeptors) als auch gegenüber anderen Verfahren (HPLC-Analyse) in der Regel um den Faktor 2 kleiner aus [Lam et al., 1983], da neben dem Reaktionszentrum (P700-Chlorophyll a Pigment) auch das nächstliegende Chlorophyll a-Molekül des inneren Lichtsammel-Antennenapparates vom PS I, - diese sind genau wie das P700-Chlorophyll a Pigment (Monomer oder Dimer ?) am PsaA/B Genprodukt (CP1) lokalisiert, ebenfalls oxidiert wird. Dies verdoppelt die Absorptionsänderung bei 700 nm und führt zu einem um den Faktor 2 kleinerem Chlorophyll zu P700 Verhältnis (w/w). Makewicz et al. [1995a] bestimmte mit Hilfe der HPLC-Technik die Anzahl der gebundenen Chlorophyllmoleküle (Chl. a & b) pro nativem PS I-Komplex von JWB zu 189.

Die physiologischen Untersuchungen an den isolierten PS I-Komplexen aus den Kontroll- & *CO₂-Pflanzen* des Tabakwildtyps JWB bestätigen die strukturelle Veränderung des Photosyntheseapparates im Bereich von Photosystem I bei den *CO₂-Pflanzen*.

D.h., die Zunahme der Core-Komplexe im Photosystem I der *CO₂-Pflanzen* führt zu einer beträchtlichen Steigerung der Aktivität als auch zu einer starken Abnahme des Verhältnisses Chlorophyll zu P700 (w/w) gegenüber den Kontrollen.

Bei der chlorophyllarmen Tabakmutante Su/su liegt das mittlere P700-Signal der isolierten PS I-Komplexe der *CO₂-Pflanzen* deutlich unter dem der Kontrollpräparationen (um Faktor 1,6 kleiner). Auch die Aktivität der *CO₂ PS I-Komplexe* fällt gegenüber den Kontrollen im Mittel um - 33 % kleiner aus (um Faktor 1,5 kleiner). Das Verhältnis Chlorophyll zu P700 nimmt bei den *CO₂ PS I-Komplexen* gegenüber den Kontrollpräparationen um ca. + 30 % zu.

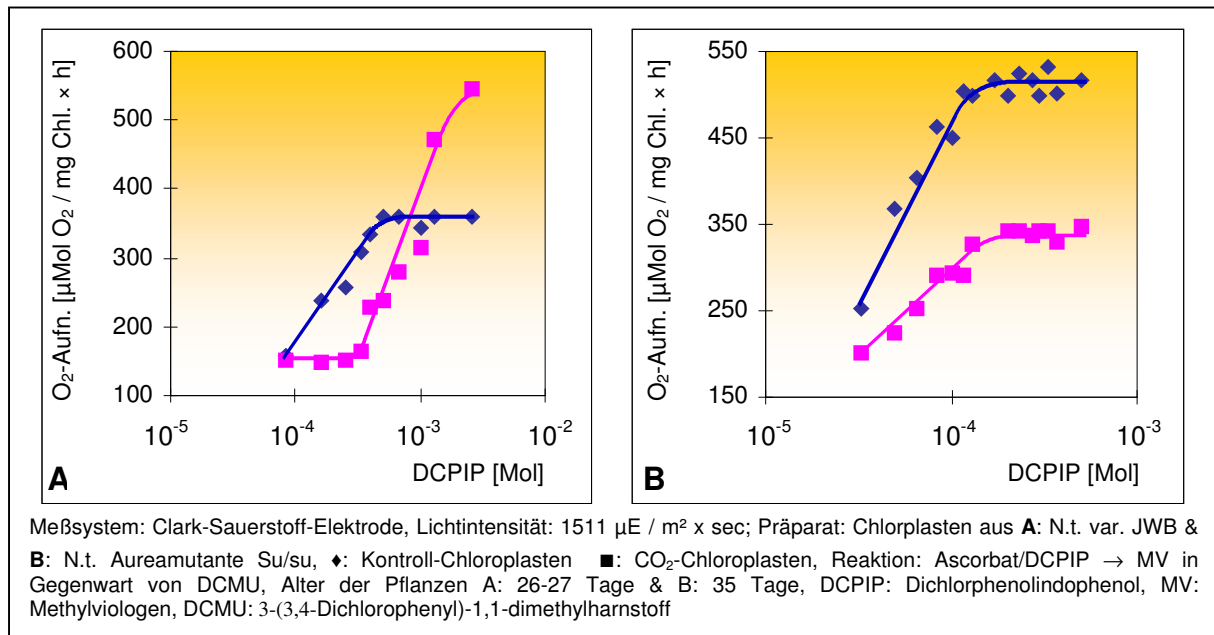
Der Vergleich der Aktivität als auch des Chlorophyll/P700 Verhältnisses der isolierten PS I-Komplexe aus den Kontroll- & *CO₂-Pflanzen* von Su/su bestätigen die strukturelle Zunahme des LHC (I & II) im Photosystem I der *CO₂-Pflanzen*.

3.10.5 Einfluß der Konzentration an DCPIP auf die Aktivität der PS I-Reaktion isolierter Chloroplasten und PS I-Komplexe.

Vergleicht man die Aktivität der PS I-Reaktion Ascorbat/DCPIP \rightarrow MV von isolierten Chloroplasten der Kontroll- & CO₂-Pflanzen des Tabakwildtyps JWB aus Tabelle 3.13 (Seite 123) mit Tabelle 3.15, so zeigt sich ein Widerspruch. Während das P700-Signal von isolierten CO₂-Chloroplasten gegenüber den Kontrollansätzen größer ist (Tabelle 3.15), liegen die Aktivitäten der CO₂-Chloroplasten, gemessen mit der Clark-Sauerstoff-Elektrode, unter denen der Kontroll-Chloroplasten (Tabelle 3.13). Wird die photosynthetische Aktivität als auch das P700-Signal isolierter Photosystem I-Komplexe aus den CO₂-Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollanzuchten gemessen, so zeigen die CO₂-PS I-Komplexe unter lichtgesättigten Meßbedingungen deutlich höhere Werte. Dies war zu erwarten gewesen, da das Wachstum der Tabakpflanze N.t. var JWB in einer erhöhten CO₂-Atmosphäre zu einem Anstieg der Core-Anteile im Photosystem I führt. Daher stellt sich die Frage, warum isolierte CO₂-Chloroplasten gegenüber den Kontrollansätzen mit der Clark-Sauerstoff-Elektrode kleinere PS I-Raten aufzeigen. Eine mögliche Ursache für den oben genannten Widerspruch kann die eingesetzte Beleuchtungsstärke sein. Während der Messung des P700-Signals mit der P700-Blitzlichtabsorptionsspektroskopie werden die isolierten Chloroplasten mit Lichtblitzen von extrem hoher Intensität bestrahlt. Daher erfolgt die Messung des P700-Signals in Chloroplasten unter lichtgesättigter Bedingung. Bei der Messung der Rate der PS I-Reaktion Ascorbat/DCPIP \rightarrow MV mit der Clark-Sauerstoff-Elektrode kann die eingesetzte Beleuchtungsstärke für die CO₂-Chloroplasten möglicherweise nicht ausreichend gewesen sein. Im Abschnitt 3.10.6 wird das Ergebnis des Vergleiches der photosynthetischen Aktivität von isolierten Chloroplasten, PS II-Membranen und PS I-Komplexen in Abhängigkeit von der Lichtintensität beschrieben. Es ist aber durchaus möglich, dass auch noch andere Ursachen für die oben genannte Diskrepanz verantwortlich sind. So könnte die Konzentration des künstlichen Elektronendonators DCPIP für das Photosystem I bei den CO₂-Chloroplasten von JWB zu niedrig gewesen sein.

Für diese Fragestellung wurde die Konzentration des Elektronendonators DCPIP (reduziert gehalten mit Na-Ascorbat) in Gegenwart von DCMU in der Meßküvette der Clark-Sauerstoff-Elektrode variiert. Die Belichtungsintensität lag bei 1511 $\mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$. Die Temperatur in der Meßküvette wurde auf 20° Celsius eingestellt. Die Konzentration an isolierten Chloroplasten lag beim Wildtyp JWB bei 20 μg Chlorophyll und bei der Mutante Su/su bei 10 μg Chlorophyll pro Ansatz.

Abbildung 3.30 Einfluß der DCPIP-Konzentration auf die Aktivität der PS I-Reaktion in Chloroplasten von *Nicotiana tabacum* var. JWB (A) & der Aureamutante Su/su (B), angezogen unter natürlicher- (350 ppm CO₂) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm).



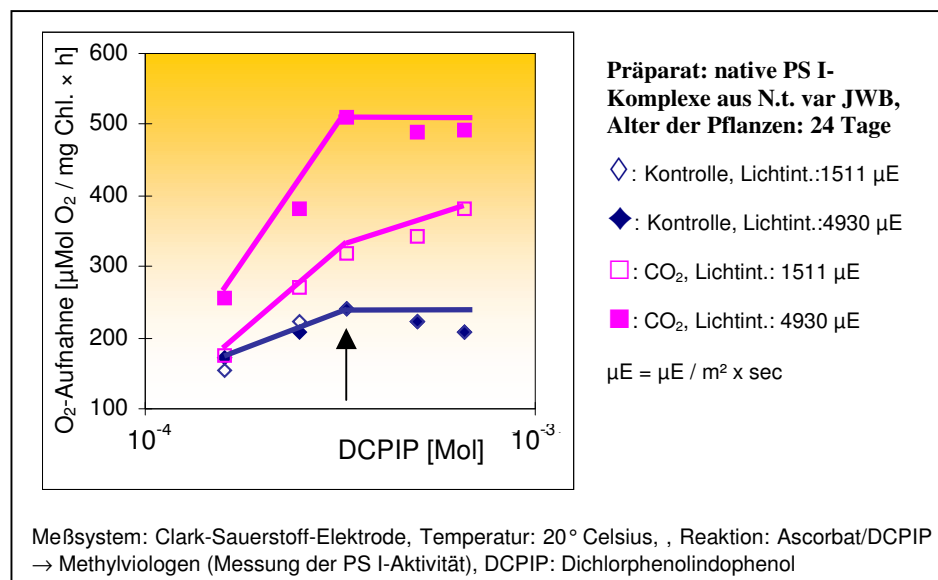
Bei den *Kontroll-Chloroplasten* von JWB zeigt die Entwicklung der O₂-Aufnahme in Abhängigkeit von der DCPIP-Konzentration (gemessen mit der Clark-Sauerstoff-Elektrode) einen typischen Sättigungsverlauf auf (siehe Abbildung 3.30A). Zunächst steigt die PS I-Aktivität in den isolierten Chloroplasten der Kontroll-Pflanzen von JWB mit zunehmender Konzentration an DCPIP im Meßansatz proportional an. Ab 0,5 mMol DCPIP wird die Sättigung der PS I-Reaktion in den Kontroll-Chloroplasten durch den Elektronendonator erreicht. Die *CO₂-Chloroplasten* von JWB zeigen dagegen einen anderen Verlauf der O₂-Aufnahme in Abhängigkeit von der Konzentration des Elektronendonators DCPIP (reduziert gehalten durch Ascorbat). Zunächst führt der Anstieg der DCPIP-Konzentration im Meßansatz bis auf 0,25 mMol zu keiner Steigerung der Aktivität der PS I-Reaktion. Erst ab 0,33 mMol beginnt die Aktivität der PS I-Reaktion mit zunehmender Konzentration an DCPIP im Meßansatz proportional anzuwachsen. Ab 1,3 mMol DCPIP erreichen die *CO₂-Chloroplasten* deutlich höhere PS I-Raten als die Kontroll-Chloroplasten. Eine Sättigung der PS I-Aktivität in den *CO₂-Chloroplasten* mit DCPIP konnte nicht erreicht werden. Dieser veränderte Kurvenverlauf bei den *CO₂-Chloroplasten* gegenüber den Kontrollansätzen von JWB deutet auf eine veränderte Donorspezifität im Photosystem I hin. Die Erhöhung der Konzentration an DCPIP im Meßansatz führt nach der Nernst'sche Gleichung [Holleman und Wiberg, 1956] zu einem Anstieg des Redoxpotentials des Elektronendonors DCPIP. Möglicherweise liegt bei den *CO₂-Chloroplasten* im Bereich des Photosystems I eine andere Redoxpotentialabhängigkeit vor. Zudem kann die sigmoide Form der Kurve bei den *CO₂-Chloroplasten* eine Folge eines kooperativen Effekts, wie man ihn vom Hämoglobin her kennt, im Photosystem I oder im Bereich des Photosystems I sein.

Das Ergebnis zeigt, dass isolierte Chloroplasten aus den *CO₂-Pflanzen* von JWB bei einer Konzentration von 0,33 mM DCPIP im Meßansatz zur Messung der PS I-Reaktion, bei der die Kontroll-Chloroplasten gesättigt sind, nicht mit dem künstlichen Elektronendonator gesättigt sind.

Die Abb. 3.30B zeigt die O₂-Aufnahme der PS I-Reaktion in Chloroplasten der Tabakmutante Su/su in Abhängigkeit von der DCPIP Konzentration im Meßansatz. Beide Chloroplasten-Typen zeigen typische Sättigungskurven der Aktivität der PS I-Reaktion im Bezug auf die eingesetzte Menge an DCPIP auf. Die beiden Kurvenverläufe unterscheiden sich in der generellen Höhe ihrer PS I-Aktivität, weil diese auf Chlorophyll bezogen wurde. Die Aktivität der PS I-Reaktion der Kontroll- & CO₂-Chloroplasten von Su/su ist in Abhängigkeit von der DCPIP-Konzentration ab 0,2 mMol gesättigt. Gegenüber dem Wildtyp JWB tritt bei den Chloroplasten der *CO₂-Pflanzen* von Su/su keine Veränderung im Verhalten der PS I-Aktivität im Bezug auf die DCPIP-Konzentration auf.

Es stellte sich nun die Frage, ob isolierte PS I-Komplexe aus den *CO₂-Pflanzen* des Wildtyps JWB ebenfalls ein verändertes Verhalten der Aktivität in Bezug auf die DCPIP-Konzentration aufzeigen. Hierfür wurde die Aktivität der isolierten PS I-Komplexe von JWB in Abhängigkeit von der DCPIP-Konzentration unter zwei Lichtstärken gemessen.

Abbildung 3.31 Einfluß der DCPIP-Konzentration auf die Aktivität von PS I-Komplexen unter zwei verschiedenen Lichtintensitäten aus *Nicotiana tabacum* var. JWB, angezogen unter natürlicher- (350 ppm CO₂) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm).



Die Aktivität Ascorbat/DCPIP → MV der isolierten PS I-Komplexe aus den Kontrollanzuchten von JWB ist ab 0.33 mMol DCPIP gesättigt. Der Pfeil in der Abbildung 3.31 markiert die Messwerte, bei der eine Konzentration an DCPIP im Messansatz der Clark-

Sauerstoff-Elektrode von 0,33 mMol vorlag. Die Erhöhung der Lichtintensität von 1511- auf 4930 $\mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$ führt zu keinem weiteren Anstieg der Aktivität der Kontroll PS I-Komplexe, da die isolierten PS I-Komplexe schon bei der kleineren Belichtungsstärke mit Licht gesättigt sind. Ebenso bleibt der Verlauf der Sättigungskurve bei Erhöhung der Lichtintensität gleich. Bei den *CO₂ PS I-Komplexen* von JWB bewirkt die Erhöhung der Lichtintensität eine Steigerung der photosynthetischen Aktivität, weil die PS I-Reaktion unter der kleineren Belichtungsstärke nicht mit Licht gesättigt ist. Während die Aktivität der *CO₂ PS I-Komplexe* in Abhängigkeit von der DCPIP-Konzentration unter einer Lichtstärke von 1511 $\mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$ durchweg ansteigt, zeigt der Verlauf der O₂-Aufnahme im Bezug auf die DCPIP-Konzentration bei Erhöhung der Lichtintensität auf 4930 $\mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$ einen Sättigungsverlauf auf. Die Aktivität der PS I-Komplexe aus den *CO₂-Pflanzen* ist unter einer Lichtintensität von 4930,2 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{sec}$. ab 0,33 mMol DCPIP gesättigt. Somit hat keine Veränderung des Km-Wertes für DCPIP bei den PS I-Präparationen der *CO₂-Pflanzen* von JWB gegenüber den Kontrollanzuchten von JWB stattgefunden.

Dies bedeutet, dass das veränderte Verhalten der PS I-Reaktion bezüglich der DCPIP-Konzentration in den *CO₂-Chloroplasten* (siehe Abb. 3.30A) nicht auf einer strukturellen Veränderung an der Donorseite von Photosystem I (PS I) beruht.

3.10.6 Photosynthetische Aktivität isolierter Chloroplasten, PS II-Membranen und PS I-Komplexe in Abhängigkeit von der Lichtintensität.

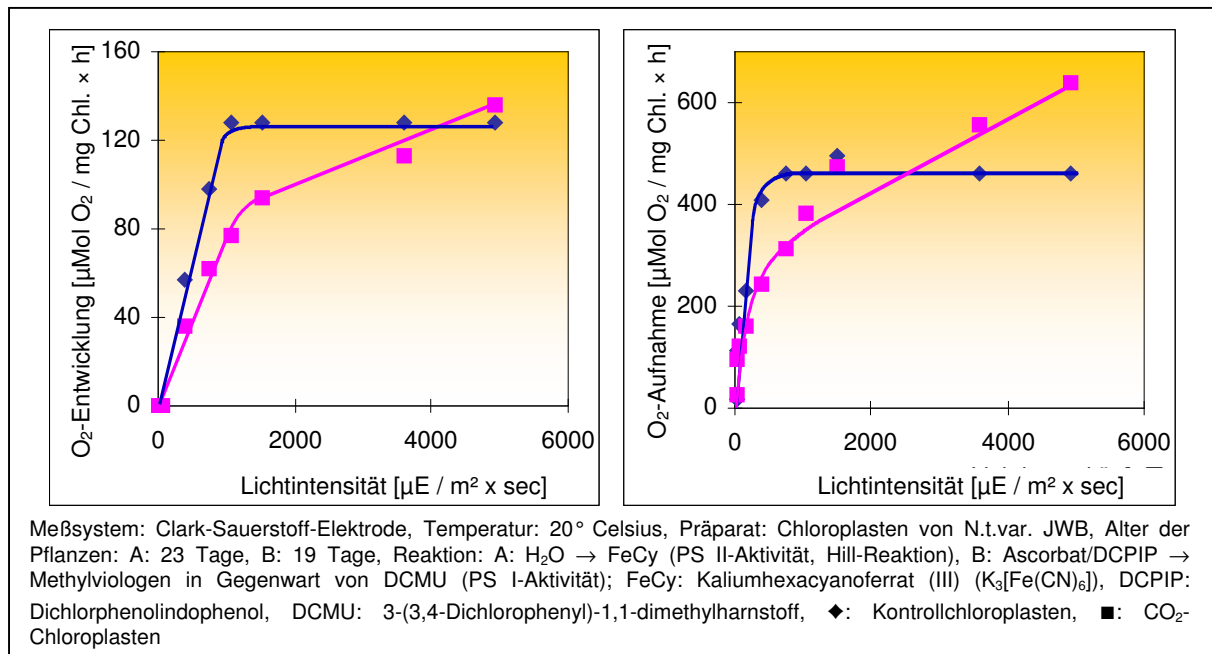
Die biochemischen Untersuchungen über die Anpassungserscheinungen des Photosyntheseapparates der beiden Tabakpflanzen JWB und Su/su an eine erhöhte CO₂-Konzentration (700 ppm) zeigten bei den beiden Tabakpflanzen eine Umgestaltung des Photosyntheseapparates auf. Die Frage stellt sich, ob diese Anpassung des Photosyntheseapparates der beiden Tabakpflanzen an eine erhöhte CO₂-Konzentration eine Veränderung in der photosynthetische Aktivität in Abhängigkeit von der Lichtintensität bewirkt. Dazu wurde die Aktivität der drei Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports: PS II-Reaktion $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$, PS I-Reaktion $\text{Ascorbat/DCPIP} \rightarrow \text{MV}$ und die Aktivität der nahezu ganze Elektronentransportkette $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$ in isolierten Chloroplasten in Abhängigkeit von der Lichtintensität in der Clark-Sauerstoff-Elektrode gemessen. Darüber hinaus wurde auch die Aktivität von PS II-Membranen und PS I-Komplexen der beiden Tabakpflanzen und ihrer *CO₂-Pflanzen* untersucht.

Bei dem Wildtyp JWB führt im Bezug auf Chlorophyll das Wachstum der Tabakpflanze unter erhöhtem CO₂ im Photosyntheseapparat zu einem Anstieg der Apoproteine der Core-Komplexe von Photosystem I & II. Der Anteil der LHC I & II-Polypeptide bleibt dabei unverändert. Dies führt zu einer Verkleinerung der Lichtsammelantenne von Photosystem I

& II. Das Chlorophyll a/b Verhältnis bleibt aber konstant. **Daher ist anzunehmen, dass ein Teil der chlorophyllbindenden Proteine von Photosystem I & II und des LHC (I & II) im Photosyntheseapparat der CO₂-Pflanzen von JWB weniger oder überhaupt kein Chlorophyll a gebunden haben.** Dies kann einen negativen Einfluß auf die Lichtaufnahme der beiden Photosysteme (I & II) haben. So zeigen die isolierten Chloroplasten der CO₂-Pflanzen von JWB gegenüber den Kontrollen erheblich kleinere PS I-Raten (Clark-Sauerstoff-Elektrode, Reaktion Ascorbat/DCPIP → MV; siehe Tabelle 3.13 auf Seite 123). Dem steht gegenüber, dass wenn das maximale P700-Signal der Chloroplasten der Kontroll- & CO₂-Pflanzen von JWB durch die P700-Blitzlichtabsorptionsspektroskopie gemessen wird, dass dann die CO₂-Chloroplasten deutlich höhere P700-Signale als die entsprechenden Kontrollpräparationen (siehe Tabelle 3.15 auf Seite 129) zeigen. Der Unterschied im Ergebnis zwischen den beiden Meßmethoden liegt in der Lichtintensität. Denn die Aktivität des photosynthetischen Elektronentransports um Photosystem I (Reaktion: Ascorbat/DCPIP → MV) wurde in der Clark-Sauerstoff-Elektrode bei 1511 µE / m² x sec gemessen. Unter dieser Lichtbedingung ist die Lichtsättigung des Photosystem I im Photosyntheseapparat der CO₂-Pflanzen von JWB noch nicht erreicht. Dagegen ist bei der Messung des P700-Signals durch P700-Blitzlichtabsorptionsspektroskopie die Lichtintensität der Lichtblitze erheblich höher. In diesem Fall wird das P700-Signal des Photosystems I im Photosyntheseapparat der CO₂-Chloroplasten unter Lichtsättigung gemessen. Schon dieses Beispiel zeigt die Auswirkung der strukturellen Veränderungen im Photosyntheseapparat der CO₂-Pflanzen von JWB auf die Qualität der Lichtaufnahme durch den LHC (I & II) und durch die Lichtantenne der beiden Core-Komplexe von Photosystem I & II.

Die folgende Abbildung 3.32 zeigt die Aktivität der PS II-Reaktion (H₂O → FeCy) und der PS I-Reaktion (Ascorbat/DCPIP → MV, in Gegenwart von DCMU) in Abhängigkeit von der Lichtintensität in Chloroplasten der Tabakpflanze JWB und dessen CO₂-Pflanzen.

Abbildung 3.32 Aktivität der PS II-Reaktion ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$) und der PS I-Reaktion (Ascorbat/DCPIP \rightarrow MV, in Gegenwart von DCMU) in Abhängigkeit von der Lichtintensität in Chloroplasten von *Nicotiana tabacum* var. JWB, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO_2 -Konzentration (700 ppm).



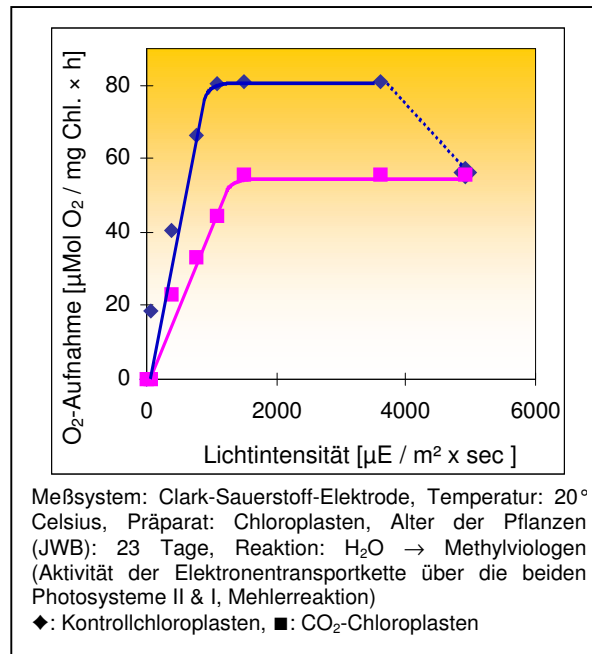
In der Abbildung 3.32 A ist der Kurvenverlauf der PS II-Reaktion und in der Abbildung 3.32 B ist der Kurvenverlauf der PS I-Reaktion in Abhängigkeit von der Lichtintensität in Chloroplasten des Wildtyps JWB zu sehen.

Die Chloroplasten der Kontrollanzucht von JWB zeigen eine typische Lichtsättigungskurve der PS II-Reaktion ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$). Die Lichtsättigung der PS II-Reaktion tritt bei den Chloroplasten der Kontrollpflanzen ab $1000 \mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$ ein. Bei den CO_2 -Chloroplasten zeigt sich ein anderer Kurvenverlauf. Im Gegensatz zu den Kontrollen steigt die Aktivität der PS II-Reaktion mit zunehmender Lichtintensität weiter an. Innerhalb der in diesem Test eingesetzten Lichtintensitäten zeigt die PS II-Reaktion in den CO_2 -Chloroplasten keine Lichtsättigung. Gegenüber den Kontrollen fällt die Aktivität der PS II-Reaktion der CO_2 -Chloroplasten zunächst kleiner aus und erreicht erst ab einer Lichtintensität von $4000 \mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$ das Niveau der Kontrollpräparationen. Die PS II-Reaktion in den isolierten Chloroplasten der Kontroll- & CO_2 -Pflanzen von JWB wurde unter gekoppelter Bedingung (ATP-Synthese, Photophosphorylierung) gemessen. Aus diesem Grund fällt die Aktivität in den CO_2 -Chloroplasten gegenüber den Kontrollen von JWB generell kleiner aus.

Der Verlauf der PS I-Reaktion (Ascorbat/DCPIP \rightarrow MV, in Gegenwart von DCMU, siehe Abb. 3.32B) in Abhängigkeit von der Lichtintensität in den Chloroplasten der Kontrollanzuchten von JWB entspricht dem Verlauf der PS II-Reaktion (Abb. 3.32A). Im Gegensatz zur PS II-Reaktion tritt die Lichtsättigung der PS I-Reaktion in den Kontroll-Chloroplasten ab $750 \mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$ ein. Dagegen zeigt die PS I-Reaktion in den CO_2 -Chloroplasten keine Lichtsättigung. Mit zunehmender Lichtintensität steigt die Aktivität der

PS I-Reaktion weiter an und übertrifft ab $3000 \mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$ die Aktivität der Kontroll-Chloroplasten.

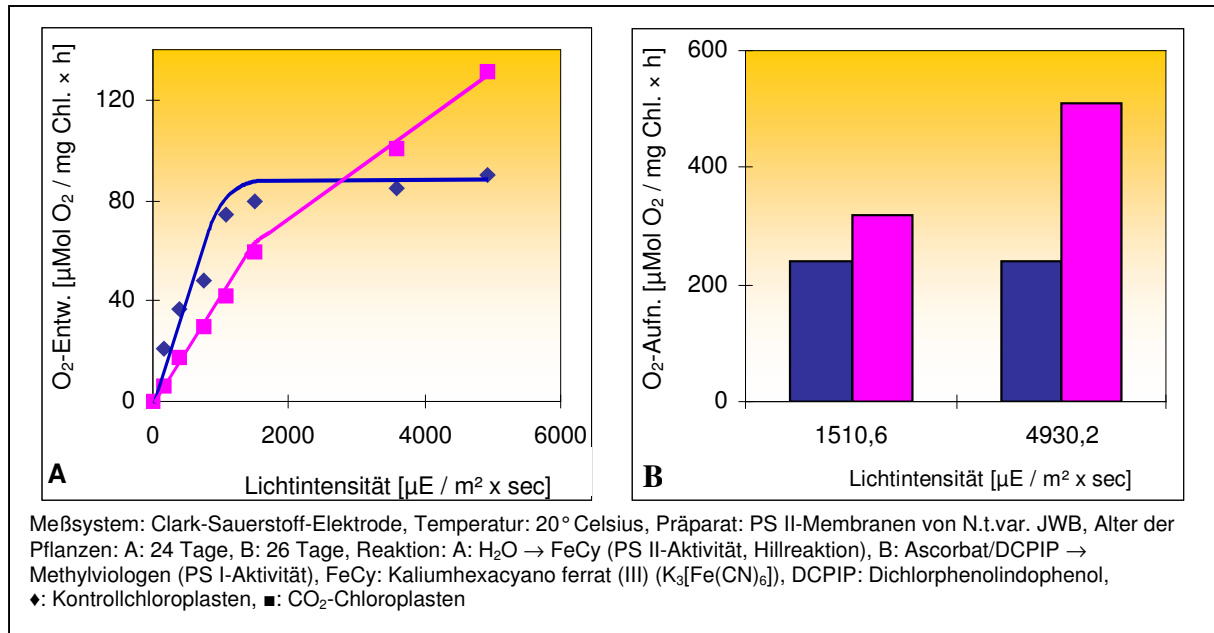
Abbildung 3.33 Aktivität der photosynthetischen Elektronentransportkette ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$) in Abhängigkeit von der Lichtintensität in Chloroplasten von *Nicotiana tabacum* var. JWB, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO_2 -Konzentration (700 ppm).



Die Abbildung 3.33 zeigt die Aktivität der photosynthetischen Elektronentransportkette von H_2O über die Photosysteme II und I nach Methylviologen in Chloroplasten von JWB. In den Kontroll-Chloroplasten ist die Aktivität der Elektronentransportkette ab $1000 \mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$ lichtgesättigt. Ab $3500 \mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$ tritt eine Photoinhibierung der photosynthetischen Elektronentransportkette in den Kontroll-Chloroplasten auf (gestrichelte Linie) ein. Bei den CO_2 -Chloroplasten von JWB tritt die Lichtsättigung der photosynthetischen Elektronentransportkette ab $1500 \mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$ ein. Während also die PS II- als auch die PS I-Reaktion in den CO_2 -Chloroplasten von JWB nicht zur Lichtsättigung gebracht werden konnte, wird die Aktivität der photosynthetischen Elektronentransportkette innerhalb des eingesetzten Lichtintensitätsbereichs lichtgesättigt. Gegenüber den Kontroll-Chloroplasten tritt die Lichtsättigung der photosynthetischen Elektronentransportkette in den CO_2 -Chloroplasten erst bei einer deutlich höheren Lichtintensität ein. Generell fällt die Aktivität der photosynthetischen Elektronentransportkette in den CO_2 -Chloroplasten gegenüber den Kontrollen deutlich kleiner aus.

Die folgende Abbildung zeigt die Aktivität von PS II-Membranen (Abb. 3.34A) und von PS I-Komplexen (Abb. 3.34B) von JWB.

Abbildung 3.34 Aktivität von PS II-Membranen ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$) und PS I-Komplexen (Ascorbat/DCPIP \rightarrow MV) in Abhängigkeit von der Lichtintensität in *Nicotiana tabacum* var. JWB, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO_2 -Konzentration (700 ppm).



Der Kurvenverlauf der Aktivität ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$) von PS II-Membranen (Abb. 3.34A) aus den Kontrollpflanzen von JWB zeigt in Abhängigkeit von der Lichtintensität eine Sättigungskurve. Die Aktivität der Kontroll PS II-Membranen ist ab 1500 $\mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$ lichtgesättigt. Bei den CO_2 PS II-Membranen führt die Erhöhung der Lichtintensität zu einer kontinuierlichen Steigerung der Aktivität. Zunächst liegt die Aktivität der CO_2 PS II-Membranen unter und ab 3000 $\mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$ über der der Kontrollpräparationen. Die Aktivität der PS II-Membranen aus den CO_2 -Pflanzen von JWB kann in diesem Test nicht zur Lichtsättigung gebracht werden.

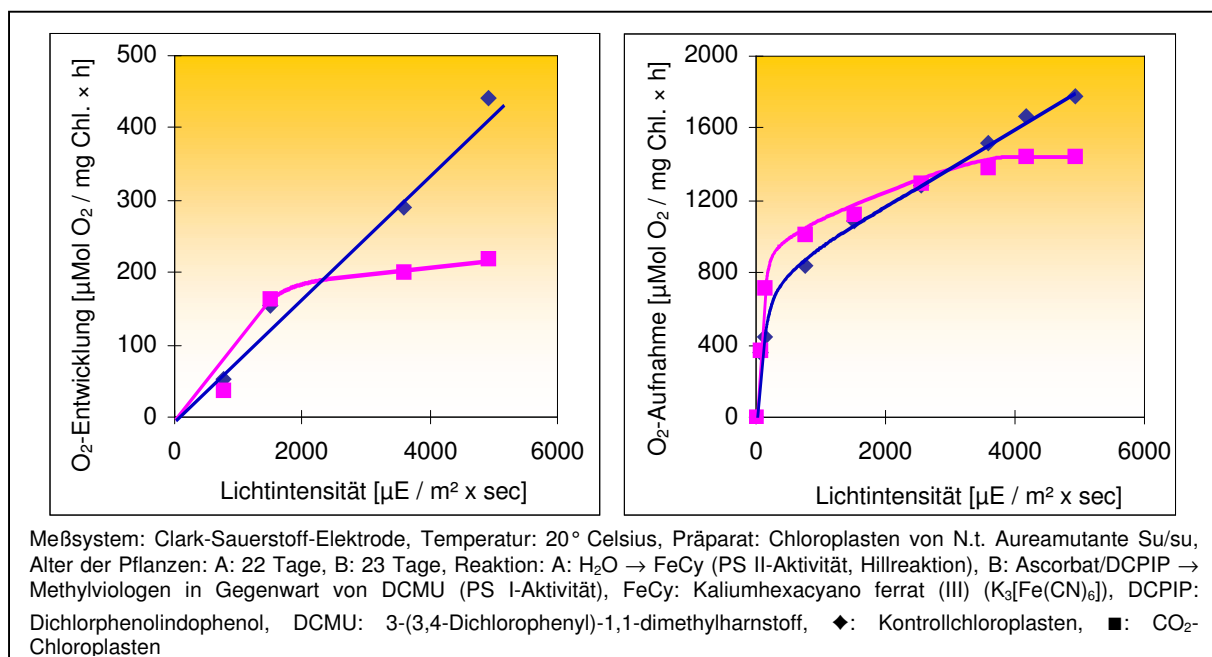
Die Abbildung 3.34B zeigt die Aktivität der PS I-Reaktion (Ascorbat/DCPIP \rightarrow MV) in nativen PS I-Komplexen von JWB in Abhängigkeit von der Lichtintensität. Während bei der Kontrollpräparation die Erhöhung der Lichtintensität von 1511- auf 4930 $\mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$ keinerlei Einfluß auf die Aktivität hat, steigt sie bei den CO_2 PS I-Komplexen von JWB beträchtlich an. D.h., dass die Aktivität der PS I-Komplexe aus den Kontrollpflanzen bei 1511 $\mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$ lichtgesättigt ist und eine weitere Steigerung der Lichtintensität zu keiner Erhöhung der Aktivität führt. Die CO_2 PS I-Komplexe von JWB sind bei 1511 $\mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$ nicht lichtgesättigt. Folglich bewirkt ein Anstieg der Lichtintensität eine Steigerung der Aktivität der CO_2 PS-I-Komplexe von JWB.

Die Aktivitäten der PS II-Reaktion und der PS I-Reaktion in isolierten Chloroplasten als auch die Aktivitäten der PS II-Membranen und der PS I-Komplexe aus den CO_2 -Pflanzen von JWB erreichen in dieser Untersuchung im Gegensatz zu den entsprechenden Kontrollpräparationen

nicht den Bereich der Lichtsättigung. **Die Zunahme der Apoproteine der Core-Komplexe von Photosystem I & II im Photosyntheseapparat der CO_2 -Pflanzen von JWB wirkt sich funktionell auf die Lichtsammlung aus.** Dies resultiert aus der Abnahme der Lichtsammelantenne der beiden Photosysteme (PS I / II). Hinzu kommt, dass der Anteil der LHC (I & II)-Polypeptide im Photosyntheseapparat der CO_2 -Pflanzen keine Veränderung erfahren hat. Daher führt der Anstieg der Apoproteine der Core-Komplexe der beiden Photosysteme in den Thylakoidmembranen zu einem deutlichen Verlust an Chlorophyll a. Dies bedeutet, dass nicht alle Chlorophyll a-Bindungsstellen im Photosyntheseapparat der CO_2 -Pflanzen von JWB mit Chlorophyll a besetzt sind. **Diese strukturelle Veränderung führt zu einer Reduktion in der Funktion der Lichtsammlung durch den Lichtsammelantennenkomplex (LHC I & II sowie die inneren Lichtantennen von PS I & II) im Photosyntheseapparat der CO_2 -Pflanzen von JWB.**

Bei der chlorophyllarmen Mutante Su/su führt das Wachstum unter erhöhtem CO_2 (700 ppm) zu einem starken Anstieg des 28 kDa LHCII-Polypeptid gegenüber den Kontrollanzuchten. Gleichzeitig ist der Anteil der Core-Komplexe von Photosystem I & II gegenüber dem Photosyntheseapparat der Kontrollpflanzen vermindert. Diese Veränderung im Photosyntheseapparat der CO_2 -Pflanzen von Su/su wird die Lichtaufnahme unter einer geringen Lichtintensität verbessern. Es ist also zu erwarten, dass die Lichtsättigung der photosynthetischen Aktivität der CO_2 -Pflanzen gegenüber den Kontrollen früher eintritt.

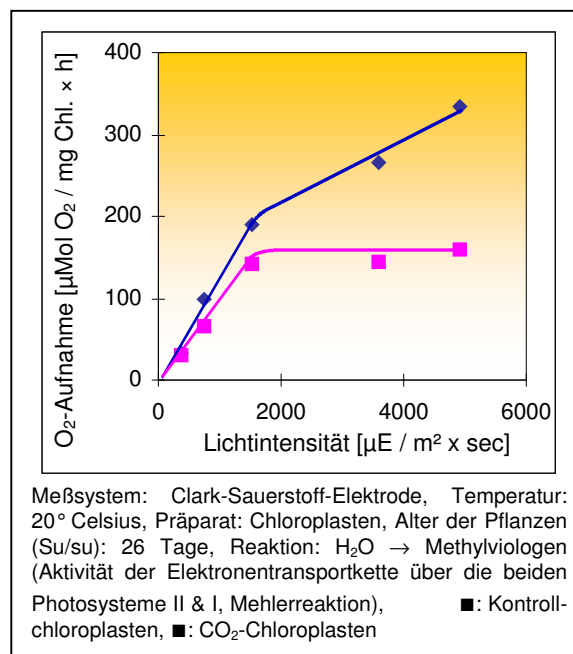
Abbildung 3.35 Aktivität der PS II-Reaktion ($H_2O \rightarrow FeCy$) und der PS I-Reaktion (Ascorbat/DCPIP \rightarrow MV, in Gegenwart von DCMU) in Abhängigkeit von der Lichtintensität in Chloroplasten von *Nicotiana tabacum* Aureamutante Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO_2 -Konzentration (700 ppm).



Die Abbildung 3.35A zeigt den Kurvenverlauf der PS II-Reaktion ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$) in Abhängigkeit von der Lichtintensität in Chloroplasten der Kontroll- & CO_2 -Pflanzen von Su/su. Die Chloroplasten der Kontrollanzuchten zeigen keine Lichtsättigung der PS II-Reaktion. Mit zunehmender Lichtintensität steigt die Aktivität der PS II-Reaktion in den Kontroll-Chloroplasten kontinuierlich an. Dagegen entspricht der Verlauf der Aktivität der PS II-Reaktion in den CO_2 -Chloroplasten einer Sättigungskurve. Ab $1500 \mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$ ist die PS II-Reaktion in den CO_2 -Chloroplasten lichtgesättigt.

In der Abbildung 3.35B ist der Kurvenverlauf der PS I-Reaktion (Ascorbat/DCPIP \rightarrow MV, in Gegenwart von DCMU) in Chloroplasten der Kontroll- & CO_2 -Pflanzen von Su/su zu sehen. Auch bei dieser Reaktion zeigen die Kontroll-Chloroplasten mit zunehmender Lichtintensität einen kontinuierlichen Anstieg der Aktivität, während die Aktivität der PS I-Reaktion in den Chloroplasten der CO_2 -Pflanzen von Su/su bei hoher Lichtintensität (ab $4000 \mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$) lichtgesättigt ist. Nun waren die Pflanzen von Su/su bei der Isolierung der Chloroplasten 23 Tage alt. Mit zunehmendem Alter steigt der Anteil des LHC (I & II) in den Thylakoidmembranen der CO_2 -Pflanzen an. Dies bedeutet, dass die Aktivität der PS I-Reaktion in den CO_2 -Chloroplasten mit zunehmendem Alter der Pflanzen schon bei erheblich kleineren Lichtintensitäten lichtgesättigt ist.

Abbildung 3.36 Aktivität der photosynthetischen Elektronentransportkette ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$) in Abhängigkeit von der Lichtintensität in Chloroplasten von *Nicotiana tabacum* Aureamutante Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO_2 -Konzentration (700 ppm).

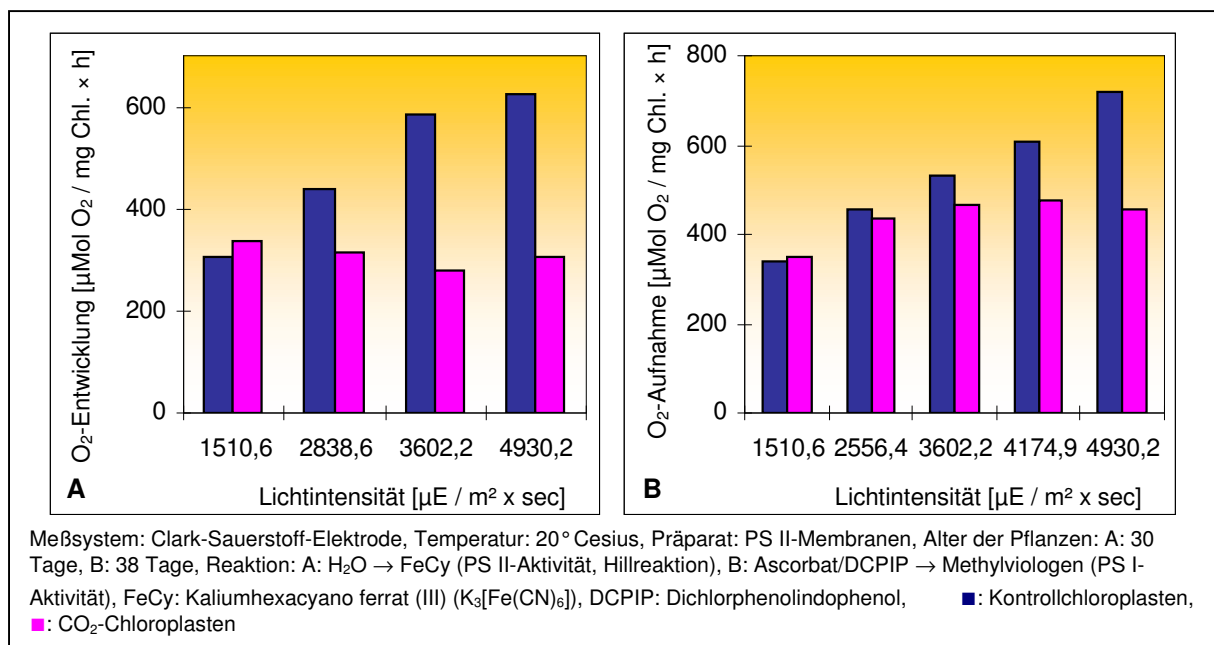


Die Aktivität der photosynthetischen Elektronentransportkette, gemessen als $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$, in den Chloroplasten der Kontrollpflanzen von Su/su steigt mit zunehmender Lichtintensität

immer weiter an (siehe Abb. 3.36). Zwar fällt der Anstieg der Aktivität der Elektronentransportkette in den Kontroll-Chloroplasten von Su/su ab $1500 \mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$ nicht mehr so steil aus, dennoch wird die Lichtsättigung nicht erreicht. Bei den Chloroplasten der CO_2 -Pflanzen von Su/su ist die Aktivität der photosynthetischen Elektronentransportkette ab $1500 \mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$ lichtgesättigt.

Die folgende Abbildung 3.37 zeigt die Aktivität isolierter PS II-Membranen und PS I-Komplexen in Abhängigkeit von der Lichtintensität.

Abbildung 3.37 Aktivität von PS II-Membranen ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$) und PS I-Komplexen (Ascorbat/DCPIP \rightarrow MV) in Abhängigkeit von der Lichtintensität von *Nicotiana tabacum* Aureamutante Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO_2 -Konzentration (700 ppm).



Die Abbildung 3.37A zeigt die Aktivität ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$) der PS II-Membranen in Abhängigkeit von der Lichtintensität. Die isolierten PS II-Membranen aus den Kontrollpflanzen von Su/su zeigen mit zunehmender Lichtintensität einen kontinuierlichen Anstieg der Aktivität. Zwar fällt der Anstieg der Aktivität bei den hohen Lichtintensitäten (von $3602 \mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec} \rightarrow 4930 \mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$) nicht mehr ganz so stark aus, aber eine Lichtsättigung der Aktivität der PS II-Membranen aus den Kontrollanzuchten wird in diesem Test nicht erreicht. Bei den PS II-Membranen der CO_2 -Pflanzen von Su/su führt die Steigerung der Lichtintensität über $1511 \mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$ zu keinem weiteren Anstieg der Aktivität. Die Aktivität der CO_2 PS II-Membranen ist ab $1511 \mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$ lichtgesättigt. Dies war zu erwarten gewesen, da die Aktivität der PS II-Reaktion ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$) in Chloroplasten der CO_2 -Pflanzen von Su/su ab $1500 \mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$ ebenfalls lichtgesättigt ist. In der Abbildung 3.37B ist die Aktivität isolierter PS I-Komplexe aus den Kontroll- & CO_2 -Pflanzen von Su/su in Abhängigkeit von der Lichtintensität dargestellt. Während die Aktivität

der isolierten PS I-Komplexe in diesem Test nicht in den Bereich der Lichtsättigung gebracht werden kann, ist die Aktivität der *CO₂ PS I-Komplexe* von Su/su ab 3600 $\mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$ (wahrscheinlich schon ab 3000 $\mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec}$) lichtgesättigt.

Bei der chlorophyllarmen Mutante Su/su führt das Wachstum der Pflanzen unter erhöhtem CO₂ (700 ppm) zu einer Vergrößerung der Lichtantenne im Photosyntheseapparat. Es war also zu erwarten gewesen, dass die Aktivitäten der drei Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports in den Chloroplasten als auch der isolierter PS II-Membranen und PS I-Komplexe aus den *CO₂-Pflanzen* von Su/su in Abhängigkeit von der Lichtintensität gegenüber den entsprechenden Kontrollpräparationen schon bei erheblich kleineren Lichtintensitäten abgesättigt sind. Das Ergebnis dieser Untersuchung an der chlorophyllarmen Mutante Su/su ist:

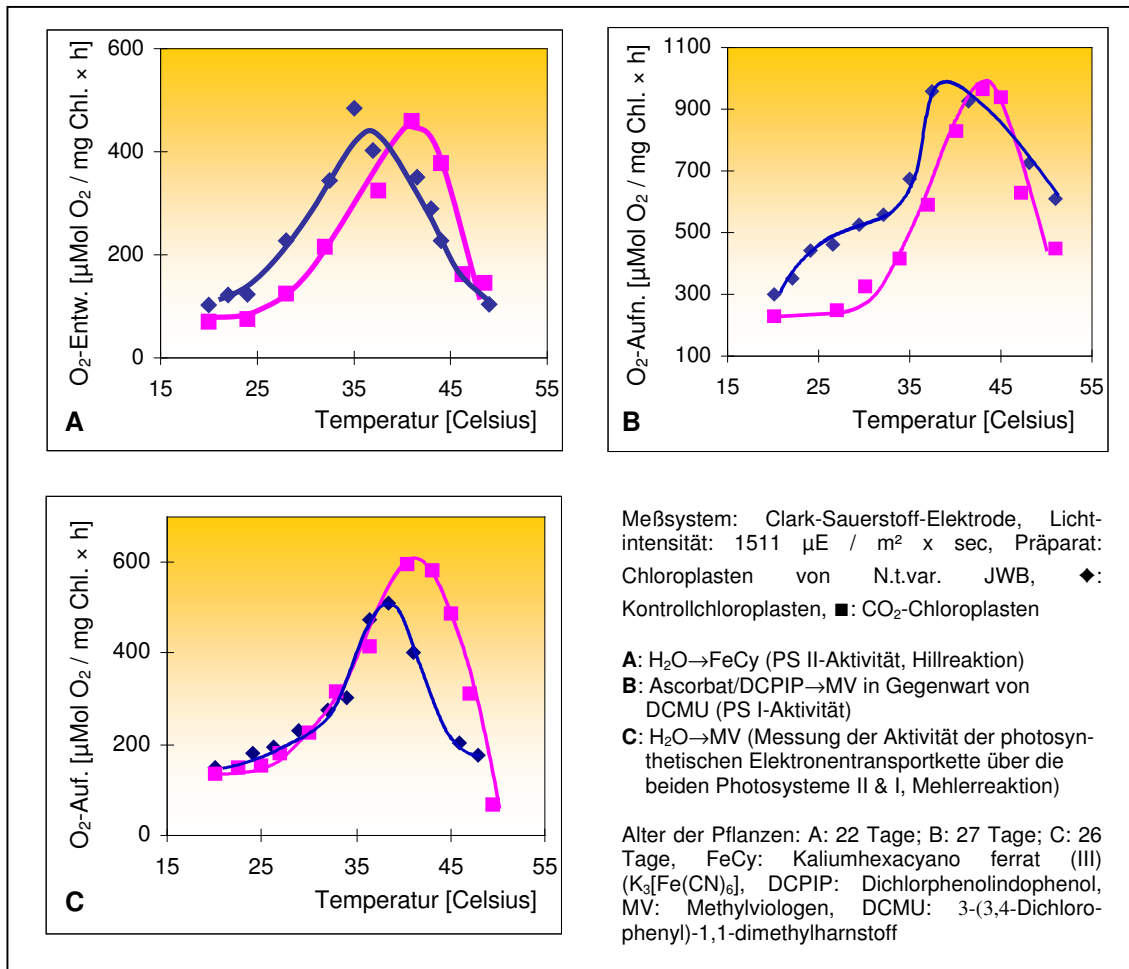
Die Aktivität der drei Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports sowie die der isolierten PS II-Membranen und PS I-Komplexe aus den Kontrollanzuchten von Su/su steigt mit zunehmender Lichtintensität an, während die Verläufe der Aktivität der entsprechenden Präparationen aus den *CO₂-Pflanzen* von Su/su mehr oder weniger typische Sättigungskurven aufzeigen. Dies entspricht der strukturellen Veränderung im Photosynthesapparat der *CO₂-Pflanzen* von Su/su.

3.10.7 Einfluss der Temperatur auf die photosynthetische Aktivität in Chloroplasten und PS II-Membranen.

Die für dieses Jahrhundert prognostizierte Steigerung der atmosphärischen *CO₂*-Konzentration auf ca. 700 ppm wird auch die globale Temperatur in der Atmosphäre beeinflussen. Als „Treibhausgas“ bewirkt es eine Reflexion der Wärmerückstrahlung der Erde (Infrarotstrahlung). Ein weiteres wichtige Klimagas ist der atmosphärische Wasserdampf. Dieser bewirkt im Zusammenspiel mit der atmosphärischen *CO₂*-Konzentration letztlich die Durchschnittstemperatur der Erde von + 15° Celsius [Alfons Baier,1999]. Somit wird sich das globale Erdklima in der Atmosphäre um 1,5° bis 4,5° Celsius in diesem Jahrhundert erwärmen [G.Bowes, 1996; Houghton et al., 1990]. Die atmosphärische *CO₂*-Konzentration wirkt also auf die Temperatur in der Atmosphäre ein. Die Frage stellt sich wie Höhere Pflanzen vom C₃-Typ sich an diese veränderte Bedingung anpassen werden. Auch ist die Frage interessant ob Höhere Pflanzen bei Wachstum unter erhöhtem *CO₂* (700 ppm) eine Temperaturerhöhung in der Atmosphäre „erwarten“.

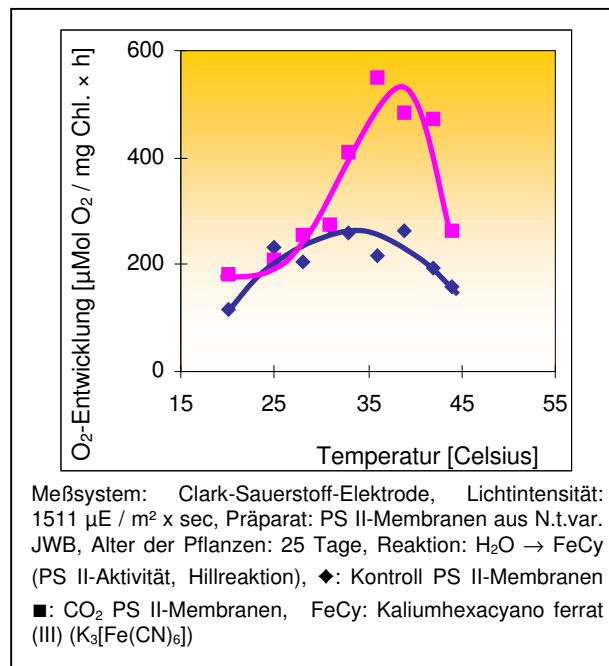
Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde der Einfluss der Temperatur auf die Aktivität von Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports in Chloroplasten und PS II-Membranen der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su und ihrer *CO₂-Pflanzen* mit Hilfe der Clark-Sauerstoff-Elektrode untersucht.

Abbildung 3.38 Abhängigkeit von Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports von der Temperatur in Chloroplasten von *Nicotiana tabacum* var. JWB, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm).



Die Abbildung 3.38 zeigt den Einfluss der Temperatur auf Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports in isolierten Chloroplasten der Kontroll- & CO₂-Pflanzen von JWB. Bei allen drei gemessenen Teilreaktionen (PS II-, PS I-Reaktion & photosynthetische Elektronentransportkette) zeigen die *CO₂-Chloroplasten* eine deutlich positive Verschiebung des Temperaturoptimums gegenüber den entsprechenden *Kontroll-Chloroplasten*. Bei den Kontroll-Chloroplasten von JWB liegt das Temperaturoptimum der drei Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports bei 37° Celsius. Bei den *CO₂-Chloroplasten* liegt das Temperaturoptimum für die PS II-Reaktion (Abb. 3.38A) bei 40° Celsius, für die PS I-Reaktion (Abb.3.38B) bei 44° Celsius und für den photosynthetischen Elektronentransport (Abb. 3.38C) über die beiden Photosysteme II & I bei 40° Celsius.

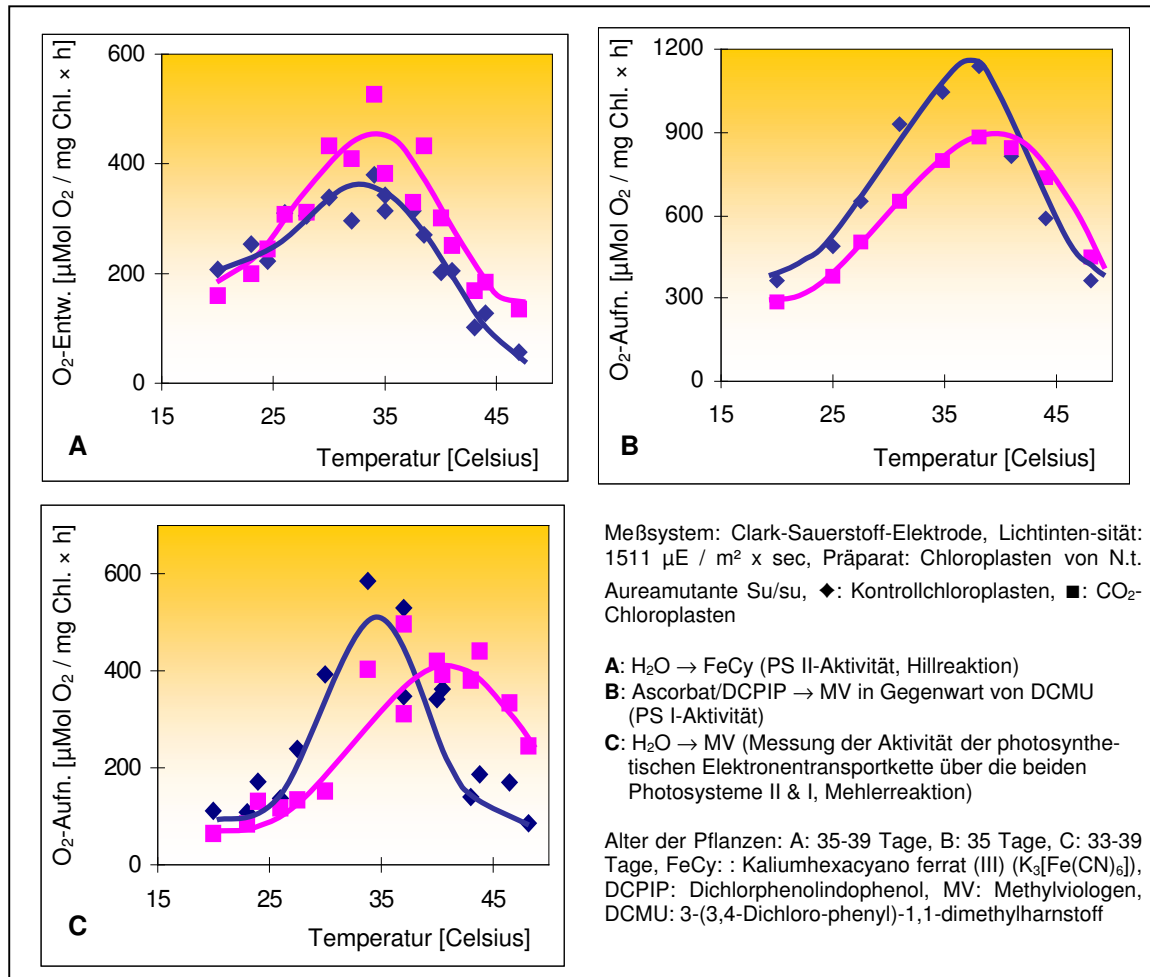
Abbildung 3.39 Abhängigkeit der Aktivität ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$) in PS II-Membranen von der Temperatur aus *Nicotiana tabacum* var. JWB, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO_2 -Konzentration (700 ppm).



Die Abbildung 3.39 zeigt die Abhängigkeit der Aktivität ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$) in PS II-Membranen aus den Kontroll- & CO_2 -Pflanzen von JWB. Das Temperaturoptimum der Aktivität liegt bei den Kontroll PS II-Membranen bei $33,5^\circ$ Celsius und bei den CO_2 PS II-Membranen bei $38,5^\circ$ Celsius.

Die Anzucht des Tabakwildtyps JWB in einer erhöhten CO_2 -Atmosphäre (700 ppm) führt also zu einer Verschiebung der Temperaturoptima verschiedener Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports in isolierten Chloroplasten und PS II-Membranen hin zu höheren Temperaturen (um 4 bis 5° Celsius). **Obwohl die Temperatur im Wachstumsexperiment konstant geblieben ist, zeigen die photosynthetische Elektronentransportreaktionen in isolierten Chloroplasten und PS II-Membranen der CO_2 -Pflanzen von JWB veränderte Temperaturoptima.**

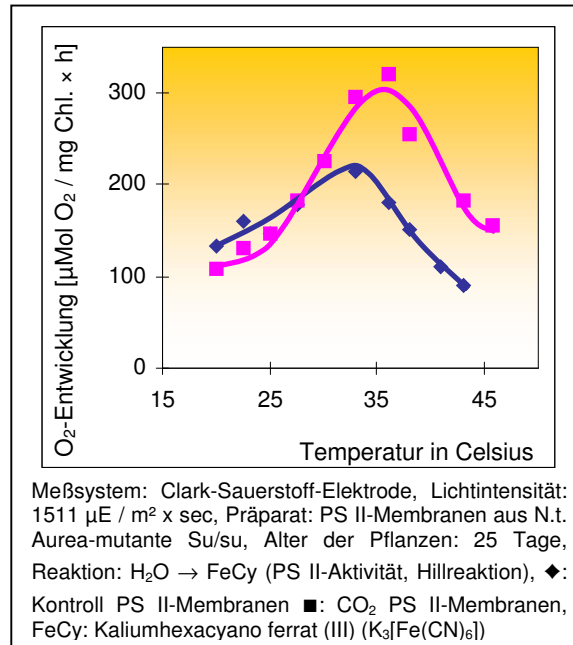
Abbildung 3.40 Abhängigkeit von Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports von der Temperatur in Chloroplasten von *Nicotiana tabacum* Aureamutante Su/su, angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm).



Die Abbildung 3.40 zeigt den Einfluss der Temperatur verschiedener Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports in Chloroplasten der Tabakmutante Su/su. Die Abbildung 3.40A zeigt die Temperaturkurve der PS II-Reaktion (H₂O → FeCy). Das Temperaturoptimum der PS II-Reaktion liegt bei den Kontroll-Chloroplasten bei 32,5° Celsius und bei den CO₂-Chloroplasten von Su/su bei 34,5° Celsius. Die Abb. 3.40B zeigt die Abhängigkeit der PS I-Reaktion (Ascorbat/DCPIP → MV in Gegenwart von DCMU) von der Temperatur. Bei den Kontroll-Chloroplasten liegt das Temperaturoptimum bei 35,5° Celsius und das der CO₂-Chloroplasten bei 38,5° Celsius. Das Temperaturoptimum der photosynthetischen Elektronentransportkette über die beiden Photosysteme II & I liegt bei den Kontroll-Chloroplasten bei 34° Celsius (siehe Abb. 3.40C). Bei den CO₂-Chloroplasten verschiebt sich das Temperaturoptimum um 6° auf 40° Celsius. Die CO₂-Chloroplasten zeigen gegenüber den Kontrollpräparationen eine deutliche Verschiebung des Temperatur-

optimums der drei Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports hin zu höheren Temperaturen.

Abbildung: 3.41 Abhängigkeit der Aktivität ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$) in PS II-Membranen von der Temperatur aus *Nicotiana tabacum* Aurea-mutante Su/su, angezogen **unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO_2 -Konzentration (700 ppm)**.



Die Abbildung 3.41 zeigt den Einfluss der Temperatur auf die Aktivität ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$) von PS II-Membranen der Kontroll- & CO_2 -Pflanzen von Su/su. Bei den PS II-Membranen der Kontrollanzuchten liegt das Temperaturoptimum bei 33° Celsius, während das isolierter PS II-Membranen der CO_2 -Pflanzen von Su/su bei 35,5° Celsius liegt.

Die chlorophyllarme Mutante Su/su zeigt bei Wachstum unter einer erhöhten CO_2 -Atmosphäre (700 ppm) eine Verschiebung der Temperaturoptima der verschiedenen Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports in isolierten Chloroplasten und PS II-Membranen hin zu höheren Temperaturen.

4

Diskussion

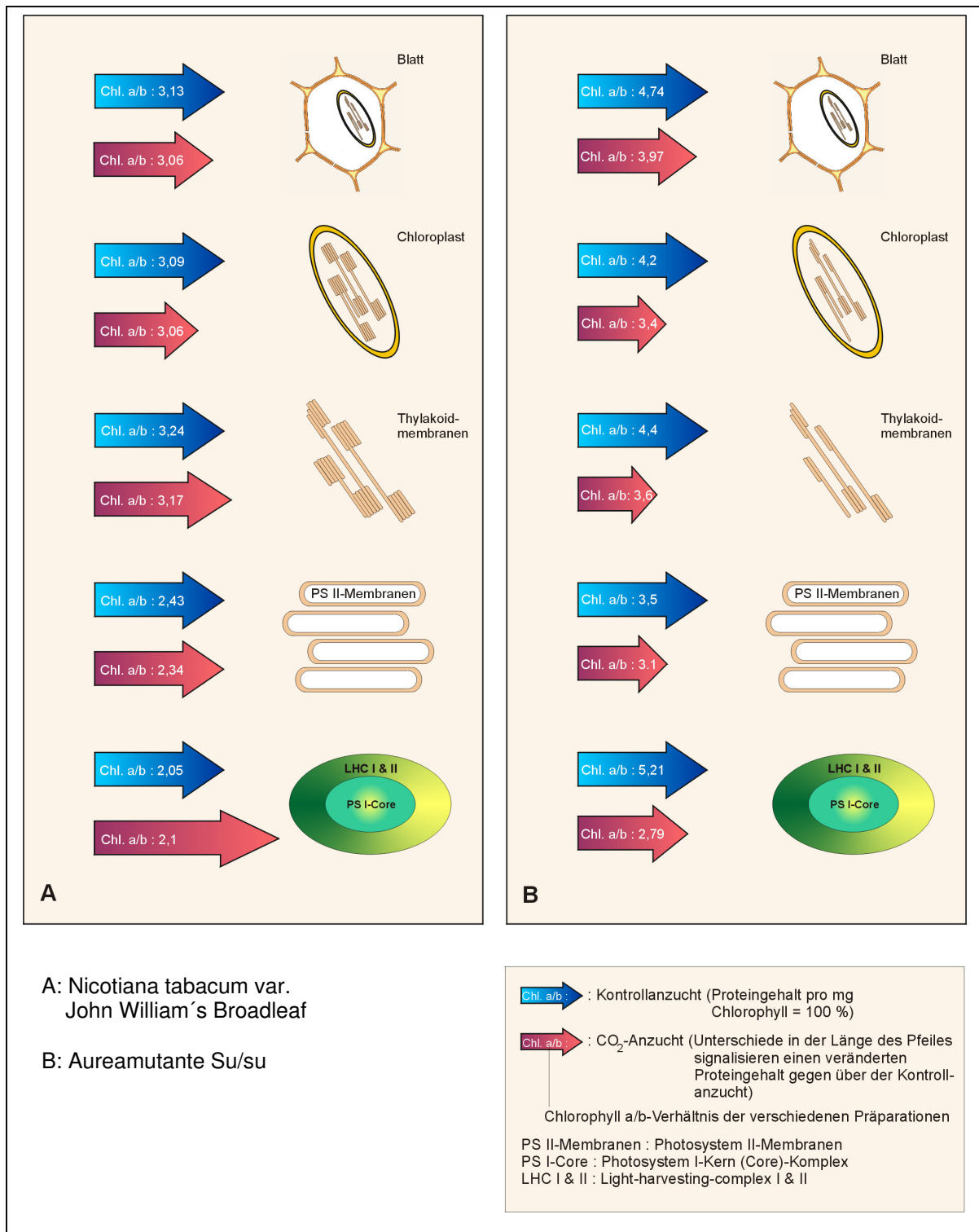
4.1 Pflanzenwachstum und Blatthabitus

Das Wachstum der Pflanzen (Abb.3.3 Seite 59) und das Blattflächenwachstum (Abb.3.2 Seite 57) der beiden Tabaksorten sind bei Wachstum unter erhöhtem CO₂ deutlich erhöht. Dies war ein zu erwartendes Ergebnis, da dies in der Literatur an vielen Stellen bereits beschrieben ist [Bowes, 1996; Cure and Acock, 1986; Kimball, 1983]. Dabei zeigen die *CO₂-Pflanzen* ab Ende der dritten Woche eine Veränderung der Blattform (Abb.3.4 Seite 59). Es tritt offenbar ein verstärktes Längenwachstum ein, was dazu führt, dass sich die Blattränder leicht nach innen einrollen. Dies mag auf einer unterschiedlichen Nährstoffbilanz im Blattgewebe der *CO₂-Pflanzen* beruhen. Zudem tritt eine Veränderung des stomatären Verhaltens bei den *CO₂-Pflanzen* der beiden Tabakpflanzen ein, wie es für C₃-Pflanzen typisch ist [E. Reining, 1994]. Dies bedeutet, dass die beiden Tabakarten *Nicotiana tabacum John William's Broadleaf* (JWB) und die Mutante Su/su CO₂ sensitive Stomata besitzen [E. Reining, 1994].

4.2 Pigment- und Proteinbestimmung

In dieser Arbeit wurden die Chlorophyll-, Carotinoid- und die Proteinmengen der Blätter, Chloroplasten, Thylakoidmembranen, Photosystem II-Membranen und Photosystem I-Komplexe der beiden Tabakpflanzen JWB & Su/su und ihrer *CO₂-Pflanzen* untersucht. Die folgende Abbildung zeigt die wichtigsten Ergebnisse dieser Untersuchung (Abschnitt 3.3, Tabelle 3.1 bis Tabelle 3.5).

Abbildung 4.1 Vergleich des Proteingehaltes und des Chlorophyll a/b Verhältnisses der verschiedenen Präparationen zwischen den Kontroll- und CO₂-Pflanzen von N.t. var. JWB und Su/su



Die Länge des blauen Pfeiles zeigt den Proteingehalt pro mg Chlorophyll, der bei der Kontrollanzucht gleich 100 % gesetzt wurde. Die unterschiedliche Länge des roten Pfeiles gibt den Proteingehalt pro mg Chlorophyll der verschiedenen Präparationen der CO₂-Pflanzen

gegenüber der Kontrollanzucht wieder. In die Pfeile ist das Chlorophyll a/b Verhältnis der verschiedenen Präparationen geschrieben. Da die Chlorophyll / Carotinoid Verhältnisse zwischen den Kontrollanzuchten und den unter erhöhtem CO₂ aufgezogenen Pflanzen und deren Präparationen im Großen und Ganzen gleich geblieben sind, sind diese Werte nicht in die Abbildung 4.1 mit eingeschlossen.

Bei den beiden Tabakpflanzen JWB und der Mutante Su/su erfährt der mittlere Gehalt an Gesamtchlorophyll pro cm² Blattfläche durch die Verdopplung der CO₂-Konzentration auf 700 ppm keine Veränderung wie Tabelle 3.1 auf Seite 61 zeigt.

Beim Wildtyp JWB sind die Unterschiede im Proteingehalt zwischen den Kontroll- und CO₂-Anzuchten nur bei den Chloroplasten- und den PS I-Präparationen deutlich, wie die Abb. 4.1 A zeigt. Die Anzucht von Tabak unter erhöhtem CO₂ hat keinen großen Einfluss auf den Proteingehalt pro mg Chlorophyll im Blattgewebe. Dies gilt auch für die isolierten Thylakoidmembranen und PS II-Membranen. Während der Proteingehalt bei den CO₂-Chloroplasten unter dem der Kontrollpräparationen liegt, ist der Proteingehalt pro mg Chlorophyll bei den isolierten PS I-Komplexen deutlich angestiegen. Ob der geringere Proteingehalt in den CO₂-Chloroplasten von JWB auf eine geringere Zuteilung an Stickstoff oder auf einen verstärkten Proteinexport aus den Chloroplasten zurückzuführen ist, bleibt offen. Es bei den CO₂-Pflanzen offenbar zu einer veränderten Verteilung an Protein im Chloroplasten und zwar zwischen der Chloroplastenmatrix und dem Lamellarsystem gekommen, da der Proteingehalt pro mg Chlorophyll bei den CO₂-Thylakoidmembranen gegenüber den Kontrollpräparationen in etwa gleich ausfällt, was bedeutet, dass in der Chloroplastenmatrix der CO₂-Pflanzen ein Verlust an Protein eingetreten ist.

Der deutlich höhere Proteingehalt pro mg Chlorophyll bei den PS I-Komplexen aus den CO₂-Pflanzen von JWB gegenüber den Kontrollpräparationen signalisiert eine strukturelle Veränderung im CO₂ PS I-Komplex gegenüber den PS I-Komplexen aus den Kontrollanzuchten. Da die Proteinmenge bei den isolierten Thylakoid- und PS II-Membranen zwischen den Kontroll- und CO₂-Anzuchten gleichhoch ausfällt, die Proteinmenge in isolierten PS I-Komplexen aus den CO₂-Pflanzen gegenüber den Kontrollpräparationen aber deutlich größer ist, könnte daraus geschlossen werden, dass in den CO₂-Thylakoidmembranen eine Umverteilung von Protein eingetreten ist. Die Ausbeute an isolierten PS I-Komplexen, gemessen in mg Chlorophyll, fiel bei den Kontroll- und CO₂-Pflanzen von JWB im Bezug auf die eingesetzte Chlorophyllmenge bei den CO₂-Pflanzen immer größer aus. Auch die Markierung des Reaktionszentrums (PsaA/B Genprodukt) von PS I fällt im Westernblot der CO₂-Thylakoidmembranen gegenüber der Kontrollpräparation deutlich stärker aus (Abb. 3.20 auf Seite 102).

Die Abbildung 4.1 A zeigt auch das Chlorophyll a/b Verhältnis der verschiedenen Präparationen aus JWB. Diese fallen bei allen Präparationen zwischen den Kontroll- und CO₂-Pflanzen gleichhoch aus. Erstaunlich ist dabei, dass gerade bei den isolierten CO₂ PS I-Komplexen das Chlorophyll a/b Verhältnis gegenüber den Kontrollpräparationen gleichhoch

ausfällt, obwohl der Proteingehalt pro mg Chlorophyll bei den *CO₂ PS I-Komplexen* gegenüber den Kontrollen deutlich größer ist. Das SDS-PAGE der isolierten *CO₂ PS I-Komplexen* zeigt keine qualitativen Unterschiede im Bandenmuster gegenüber den Kontrollpräparationen, wie Abb. 3.16 auf Seite 95 zeigt. Da jedoch der Anteil der Core-Peptide im *CO₂ PS I-Komplex* im SDS-Page deutlich verstärkt auftritt (Abb. 3.16 auf Seite 95), hätte man einen Anstieg des Chlorophyll a/b Verhältnis messen müssen, denn Chlorophyll b ist ausschließlich am LHC gebunden [H.Y. Yamamoto und R. Bassi, 1996]. Das Mehr an Protein ist also bei den *CO₂ PS I-Komplex* in die Core-Peptide eingebaut.

Die Abbildung 4.1.B zeigt die Unterschiede im Proteingehalt pro mg Chlorophyll und im Chlorophyll a/b Verhältnis zwischen den verschiedenen Präparationen aus den Kontroll- und *CO₂-Pflanzen* der Mutante Su/su. Bei den Blattpräparationen zeigen sich keine großen Unterschiede im Proteingehalt zwischen Kontroll- und *CO₂-Anzucht*. Bei den Chloroplasten-, den Thylakoidmembran- und den PS II-Membranpräparationen ist die Proteinmenge pro mg Chlorophyll aus den *CO₂-Pflanzen* gegenüber den Kontrollen deutlich reduziert. Beim *CO₂ PS I-Komplex* fällt der Unterschied im Abfall der Proteinmenge gegenüber der Kontrollpräparation nicht ganz so groß aus, was aber auf die Präparationstechnik zurückzuführen sein kann, da die isolierten PS I-Komplexe aus der Mutante Su/su nicht ganz rein sind. Die Anzucht der Mutante Su/su unter erhöhtem *CO₂* führt zu einem deutlichen Abfall der Proteinmenge bei den Chloroplasten und des darin enthaltenen Lamellarsystems und deren Komponenten, während im Blattgewebe der Abfall des Proteingehaltes allgemein nur geringfügig kleiner ausfällt. In der Mutante Su/su tritt bei Wachstum unter einer erhöhten *CO₂-Atmosphäre* von 700 ppm eine Umverteilung der Proteinmenge zwischen Blattgewebe und Chloroplast ein.

Ebenso fällt das Chlorophyll a/b Verhältnis bei allen Präparationen aus den *CO₂-Pflanzen* gegenüber den Kontrollanzuchten der Mutante Su/su deutlich ab. Aus dem Chlorophyll a/b Verhältnis kann man Rückschlüsse auf den Photosyntheseapparat schließen. Ein hohes Chlorophyll a/b Verhältnis signalisiert weniger LHC im Photosyntheseapparat während ein niedrigeres Chlorophyll a/b Verhältnis auf mehr LHC im Lamellarsystem der Chloroplasten schließen läßt. Bei der Mutante Su/su, die a priori eine verkleinerte Lichtantenne besitzt [Schmid und Gaffron, 1967], führt das langzeitige Wachstum unter erhöhtem *CO₂* zu einem Anstieg der LHC-Komponente im Photosyntheseapparat. Da gleichzeitig der Proteingehalt pro mg Chlorophyll bei allen Präparationen, außer bei den Blattpräparationen, der *CO₂-Pflanze* mehr oder weniger stark abfällt, kann daraus geschlossen werden, dass der Anteil der Core-Peptide im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanze* von Su/su kleiner geworden ist. Dies bestätigt auch die Analyse der Verteilung bestimmter Polypeptide des Photosyntheseapparates mit Hilfe des Immunoblot- (Westernblot-) Verfahrens (siehe Abb. 3.22 auf Seite 106).

4.3

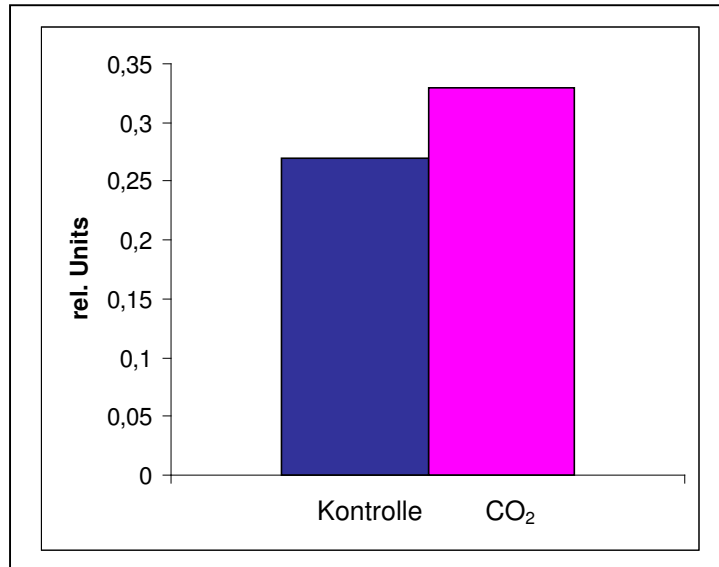
Carotinoidzusammensetzung

In dieser Arbeit wurden die isolierten Carotinoide aus Blättern und isolierten Thylakoidmembranen der Kontroll- und CO₂-Pflanzen von JWB und der Mutante Su/su mittels der HPLC-Technik in ihrer Zusammensetzung untersucht. Bei den Carotinoiden wurde zwischen β -Carotin und der Gruppe der Xanthophylle unterschieden. Die wichtigsten Xanthophylle sind Neoxanthin, Violaxanthin, Lutein, Zeaxanthin und Antheraxanthin. Untersucht wurde der Gehalt an β -Carotin, Neoxanthin, Violaxanthin und Lutein. Über die Veränderung der Verteilung der Carotinoide untereinander kann man auf eine Veränderung im Photosyntheseapparat schließen, wie die bisherige Literatur zeigt (Siehe Seite 76 und folgende im Abschnitt 3.4).

Beim Wildtyp JWB führt die Anzucht unter erhöhtem CO₂ im Blattgewebe zu einer veränderten Verteilung der Carotinoide, während die Untersuchung der Zusammensetzung der Carotinoide im Blattgewebe der Mutante Su/su keine so großen Unterschiede aufzeigt (siehe Tabelle 3.6 auf Seite 77). Da aber die Carotinoide im Blattgewebe nicht nur am Photosyntheseapparat, sondern auch in anderen Zellkompartimenten, so z.B. auch in Plastoglobuli, gebunden sind [H.K. Lichterntaler, 1969], läßt sich kein direkter Zusammenhang zum Photosyntheseapparat herstellen. Aus diesem Grunde wurden die Carotinoide aus isolierten reinen Thylakoidmembranen isoliert und analysiert.

Wie die Tabelle 3.8 auf Seite 82 zeigt, bleibt der Gehalt der Xanthophylle Neoxanthin, Violaxanthin und Lutein im Gesamtlipidextrakt der CO₂-Thylakoidmembranen gegenüber der Kontrollpräparation der Tabakpflanze JWB praktisch unverändert. Dagegen steigt der Anteil an β -Carotin im Gesamtlipidextrakt der CO₂-Thylakoidmembranen mit 23 % deutlich an. Die folgende Abbildung 4.2 zeigt das Verhältnis β -Carotin zu Lutein zwischen den Kontroll- und CO₂-Thylakoidmembranen.

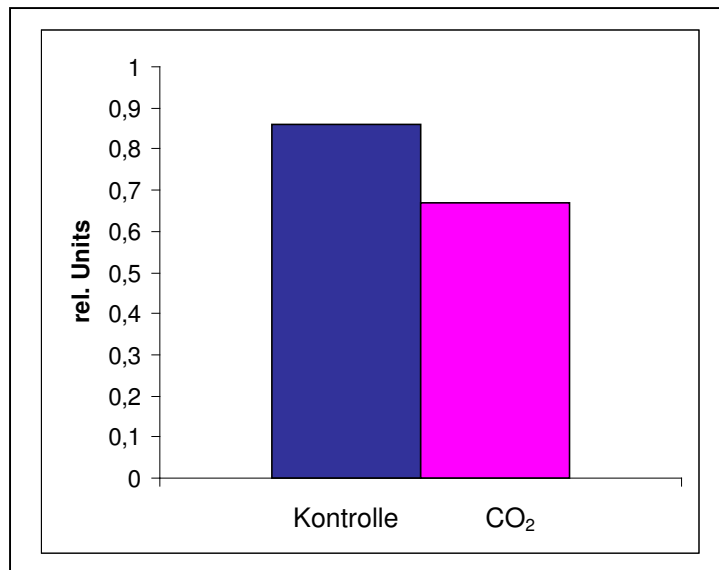
Abb. 4.2 Vergleich des β -Carotin/Lutein (w/w) Verhältnisses der Lipidextrakte, isoliert aus den Thylakoidmembranen von *Nicotiana tabacum* John William's Broadleaf (JWB), angezogen unter natürlicher- (350 ppm) und erhöhter CO_2 -Konzentration (700 ppm).



Die Abbildung 4.2 zeigt, dass das Verhältnis β -Carotin zu Lutein im Lipidextrakt der CO_2 -Thylakoidmembranen gegenüber der Kontrollpräparation um 20 % ansteigt. Da Lutein, wie auch die anderen Xanthophylle ausschließlich an den pigmentbindenden Proteine des Photosyntheseapparates gebunden sind, welche der Lichtsammlung dienen, und nur β -Carotin als einziges Carotinoid auch an den Reaktionszentren von PS I und PS II gebunden ist [H.Y. Yamamoto und R. Bassi, 1996], kann man daraus schließen, dass der Anteil der Reaktionszentren von PS I und PS II in den Thylakoidmembranen der CO_2 -Pflanze von JWB angestiegen ist. Dies bestätigen auch die Westernblot-Analysen (siehe Abb. 3.20 auf Seite 102).

Die Abbildung 4.3 zeigt das β -Carotin / Lutein Verhältnis in den Thylakoidmembranen der Kontroll- und CO_2 -Pflanzen von der Mutante Su/su.

Abb. 4.3 Vergleich des β -Carotin/Lutein (w/w) Verhältnisses der Lipidextrakte, isoliert aus den Thylakoidmembranen der Mutante Su/su, angezogen unter natürlicher (350 ppm) und erhöhter CO_2 -Konzentration (700 ppm).



Das β -Carotin/Lutein Verhältnis fällt im Lipidextrakt der CO_2 -Thylakoidmembranen gegenüber der Kontrollpräparation deutlich ab. Daraus kann geschlossen werden, dass in den Thylakoidmembranen der CO_2 -Pflanze von Su/su eine Zunahme an LHC stattgefunden hat. Dies bestätigt auch der Vergleich der Chlorophyll a/b Verhältnisse zwischen den verschiedenen Präparationen aus den Kontroll- und CO_2 -Pflanzen (Abb. 4.1). Da der β -Carotin Gehalt im Lipidextrakt der CO_2 -Thylakoidmembranen gegenüber der Kontrollpräparation absinkt, kann daraus eine Abnahme der Reaktionszentren von PS I und PS II in den Thylakoidmembranen der CO_2 -Pflanze von Su/su abgeleitet werden (siehe Tabelle 3.8 auf Seite 82). Die Westernblotanalyse ausgewählter Polypeptide des Photosyntheseapparat in Abb. 3.22 auf Seite 106 kommt zu dem selben Ergebnis.

4.4 Bestimmung der Plastochinon-Konzentration

Es wurde der Plastochinongehalt im Gesamtlipidextrakt, der aus den Thylakoidmembranen der beiden Tabakpflanzen JWB und der Mutante Su/su und ihrer CO_2 -Pflanzen isoliert wurde, mittels der HPLC-Technik untersucht.

Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt bei der Tabakpflanze JWB, dass der Plastochinongehalt bezogen auf die Lipid- als auch auf die Chlorophyllmenge bei den Thylakoidmembranen der CO_2 -Pflanze sehr stark ansteigt (siehe Tabelle 3.11 auf Seite 87). Das Wachstum des Wildtyps JWB unter erhöhtem CO_2 hat einen eindeutig steigernden Effekt auf die Konzentration an Plastochinon in den Thylakoidmembranen. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Lichtintensität einen Einfluß auf den Plastochinongehalt in Blättern von

Fagus sylvatica haben kann. Sonnenblätter dieser Art enthalten bis zu 7 mal mehr Plastochinon als Schattenblätter [H.K. Lichtentaler und K. Pfister, 1978]. Aus diesem Grunde könnte man die Erhöhung des Plastochinongehaltes in den Thylakoidmembranen der CO_2 -Pflanze von JWB als eine vermeintliche Anpassung an eine hohe Lichtintensität verstehen. Die Lichtintensität wurde im Experiment jedoch nicht erhöht. Die Westernblot-Analyse (siehe Abb. 3.20 auf Seite 102) zeigt einen mengenmäßigen Anstieg des Reaktionszentrums (D1/D2) von PS II im Photosyntheseapparat der CO_2 -Pflanze von JWB. Dies könnte natürlich auch zu einem Anstieg des Plastochinongehaltes in den CO_2 -Thylakoidmembranen führen. So konnte Hinerks et al. [1998] einen Anstieg an Plastochinon in PS II-Membranen aus CO_2 -Pflanzen von JWB nachweisen.

Bei der chlorophyllarmen Mutante Su/su fällt der Plastochinongehalt in den Thylakoidmembranen der CO_2 -Pflanzen gegenüber den Kontrollanzuchten bezogen auf die Lipidextrakt- und die Chlorophyllmenge leicht ab, wobei der Abfall an Plastochinon im Bezug auf die Chlorophyllmenge mit – 13,4 % größer ist. Dies passt zu dem Ergebnis, dass in den Thylakoidmembranen der CO_2 -Pflanze von Su/su der LHC zunimmt und die Reaktionszentren des Photosyntheseapparates abnehmen.

Dass die chlorophyllarme Mutante Su/su gegenüber dem Wildtyp JWB deutlich mehr Plastochinon im Lipidextrakt isolierter Thylakoidmembranen aufweist, liegt daran, dass die Mutante Su/su eine an Starklicht adaptierte Pflanze ist (siehe Abschnitt 3.5.2 auf Seite 88).

4.5 Analyse der Polypeptidzusammensetzung

Die bisherigen Untersuchungen (Pigment- und Proteinbestimmung, Analyse der Carotinoidzusammensetzung und der Bestimmung der Plastochinon-Konzentrations) haben nur indirekt Rückschlüsse auf den Photosyntheseapparat zugelassen. Über die Analyse der Polypeptidzusammensetzung kann man untersuchen, ob das Wachstum der beiden Tabakpflanzen unter erhöhtem CO_2 einen Einfluß auf die Polypeptide des Photosyntheseapparates hat. In dieser Arbeit wurde die Polypeptidzusammensetzung von isolierten Thylakoidmembranen und PS I-Komplexen der beiden Tabakpflanzen JWB und der Mutante Su/su und ihrer CO_2 -Pflanzen mittels der SDS-Gelelektrophorese analysiert (siehe Abschnitt 3.6).

Die Ergebnisse zeigen in der SDS-PAGE der Thylakoidmembranen und PS I-Komplexe (siehe Abb. 3.15 auf Seite 94 und Abb.3.16. auf Seite 95) der CO_2 -Pflanze von JWB einen Anstieg der Polypeptide, welche die beiden Core-Komplexe von PS I und PS II bilden. Das Wachstum des Wildtyps JWB unter einer erhöhten CO_2 -Konzentration von 700 ppm führt also zu einem Anstieg an Core-Komplexen von PS I und PS II. Dies bestätigt auch der Vergleich des β -Carotin / Lutein Verhältnisses der Thylakoidmembranen zwischen den Kontroll- und CO_2 -Pflanzen. Da aber das Chlorophyll a/b Verhältnis der CO_2 -

Thylakoidmembranen und der *CO₂-PS I-Komplexe* gegenüber den Kontrollpräparationen unverändert geblieben ist, muß eine Veränderung in der Pigmentverteilung eingetreten sein. Wie schon im Ergebnisteil 3.6 auf Seite 96 und folgende ausführlich beschrieben, kann davon ausgegangen werden, dass ein Teil der Chlorophyll-bindenden-Proteine im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanze* von JWB weniger Chlorophyll a gebunden haben muß. Normalerweise hätte man einen Anstieg des Chlorophyll a/b Verhältnisses bei den beiden Präparationen (*Thylakoidmembranen* und *PSI-Komplexe*) aus der *CO₂-Pflanze* gegenüber den Kontrollpräparationen messen müssen. Dies ist jedoch nicht der Fall.

Bei der chlorophyllarmen Mutante Su/su zeigt der Vergleich der SDS-PAGES der *Thylakoidmembranen* und *PS-Komplexe* aus den Kontroll- und *CO₂-Pflanzen* deutliche Unterschiede. Das Ergebnis dieser Untersuchung (siehe Abb. 3.17. auf Seite 97 und Abb. 3.18. auf Seite 99) ist, dass das Wachstum der Mutante Su/su unter erhöhtem *CO₂* zu einer Reduktion der Core-Komplexe und zu einem Anstieg an LHC bei PS I und PS II im Photosyntheseapparat führt. Dies bestätigt auch die indirekte Schlußfolgerung aus der Analyse der Chlorophyll a/b-Verhältnisse von isolierten *Thylakoidmembranen* und von *PS I-Komplexen*. Auch die Schlußfolgerung aus dem Vergleich des β -Carotin / Lutein Verhältnis im Lipidextrakt isolierter *Thylakoidmembranen* zwischen den Kontroll- und *CO₂-Pflanzen* wird bestätigt. Darüberhinaus ist auch eine weitere Komponente im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanze* von Su/su, nämlich der Cytochrom *b₆/f*-Komplex, reduziert.

4.6 Westernblot-Analyse

In vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe des Westernblot- (Immunoblot-) Verfahren die quantitative Verteilung bestimmter Polypeptide des Photosyntheseapparates in isolierten *Thylakoidmembranen* untersucht. Diese enthalten den gesamten Photosyntheseapparat, der die Lichtreaktion betreibt. Mit Hilfe von monospezifischen polyklonalen Antiseren gegen Polypeptide des Photosyntheseapparates wurde nun untersucht, inwieweit sich die quantitative Verteilung bestimmter Polypeptide in den *Thylakoidmembranen* zwischen den Kontroll- und *CO₂-Pflanzen* verändert hat.

Beim Wildtyp JWB zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchung deutliche Veränderung in der quantitativen Verteilung der untersuchten Polypeptiden in isolierten *Thylakoidmembranen*. Wie im Ergebnisabschnitt 3.7 (Seite 102 bis Seite 104) ausführlich beschrieben, führt die Anzucht der Tabakpflanze JWB unter erhöhtem *CO₂* zu einem Anstieg der Apoproteine von Photosystem I und II, welche die Core-Komplexe bilden. Der Gehalt an LHC, speziell des 28 kDa LHC Proteins, bleibt praktisch unverändert. Statistisch nimmt also der Gehalt an LHC pro Core-Komplex von PS I und II ab. Somit wird die photosynthetische Einheit im Photosyntheseapparat von JWB kleiner.

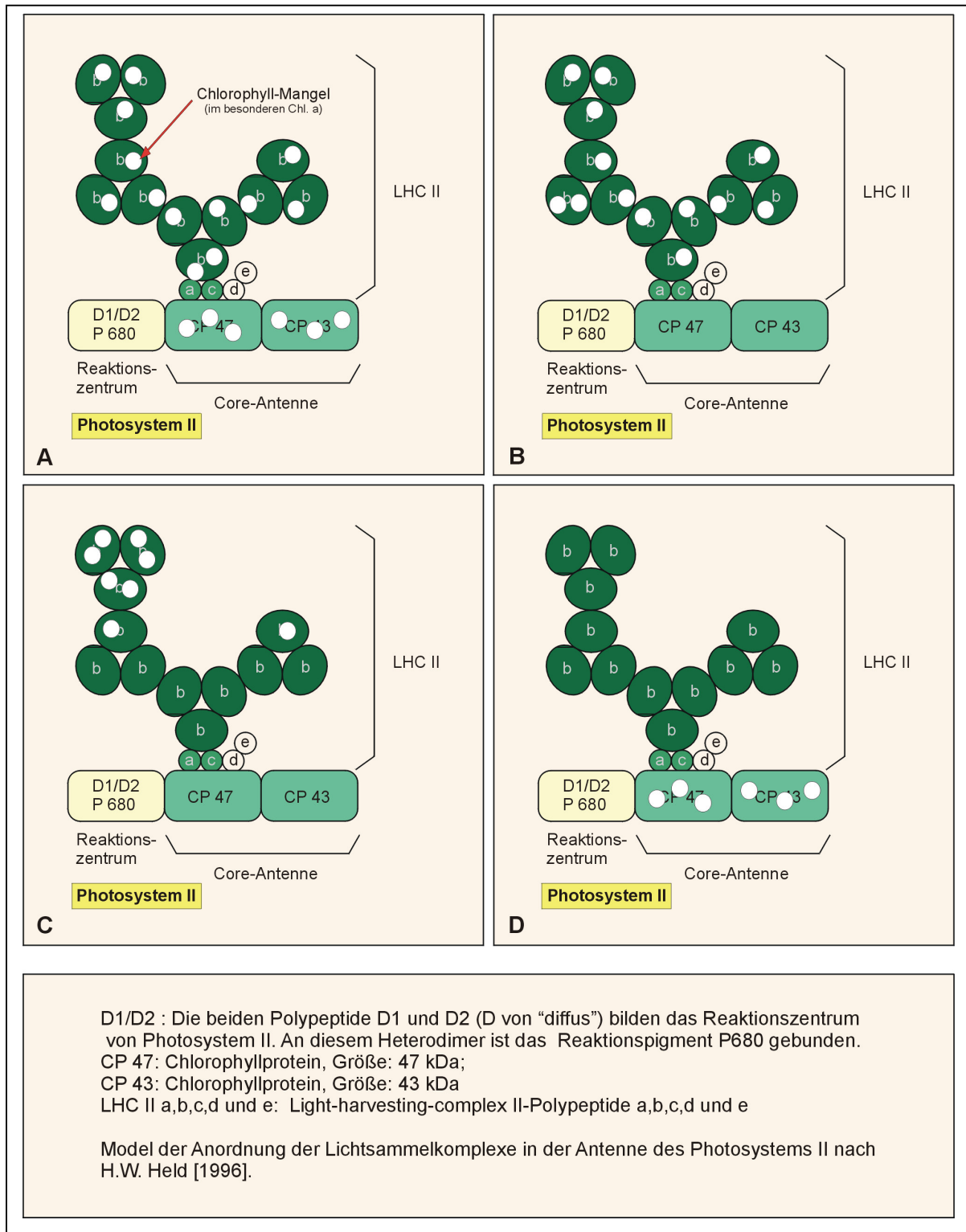
Ein weiteres neues Ergebnis dieser Untersuchung mit Hilfe des Westernblot-Verfahrens ist, dass die Markierung der α -Untereinheit des ATP-Synthase Komplexes in den Thylakoidmembranen der *CO₂-Pflanze* gegenüber der Kontrollanzucht von JWB erheblich schwächer ausfällt (siehe Abb. 3.20 auf Seite 102). Daraus kann gefolgert werden, dass die Anzucht der Tabakpflanze JWB unter erhöhtem CO₂ zu einer Reduktion der Anzahl der ATP-Synthase Komplexe im Photosyntheseapparat führt.

Wie auf Seite 103 im Ergebnisteil 3.7 ausführlich diskutiert, muß es im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanze* von JWB zu einer Umverteilung an Chlorophyll a gekommen sein. Ein Teil der Chlorophyll-bindenden Proteine von PS I und PS II weisen demnach weniger oder im Extremfall überhaupt kein Chlorophyll a auf. Dies wird auch am Beispiel vom Photosystem I besonders deutlich, wie Seite 104 - 106 im Ergebnisteil 3.7 beschreibt.

Das Wachstum des Wildtyps JWB unter erhöhtem CO₂ von 700 ppm führt also im Photosyntheseapparat zu einem Bruch in der Koordination der Biosynthese von Chlorophyll a und der Biosynthese der Core-Komplexe von PS I und PS II.

Wie man sich eine solche Umverteilung oder Nichtbesetzung von Chlorophyll a im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanze* von JWB vorzustellen hat zeigt das folgende Modell. Dieses Modell beschreibt die mögliche Auswirkung eines Chlorophyll a Defizits am Modell von Photosystem II. Dies gilt letztlich auch für Photosystem I. Die nicht besetzten Bindungsstellen für Chlorophyll a sind in der folgenden Abbildung 4.4 als weiße runde Flecken dargestellt.

Abbildung 4.4 Modellhafte Darstellung der Möglichkeiten der Chlorophyll- Verminderung im Photosystem II.

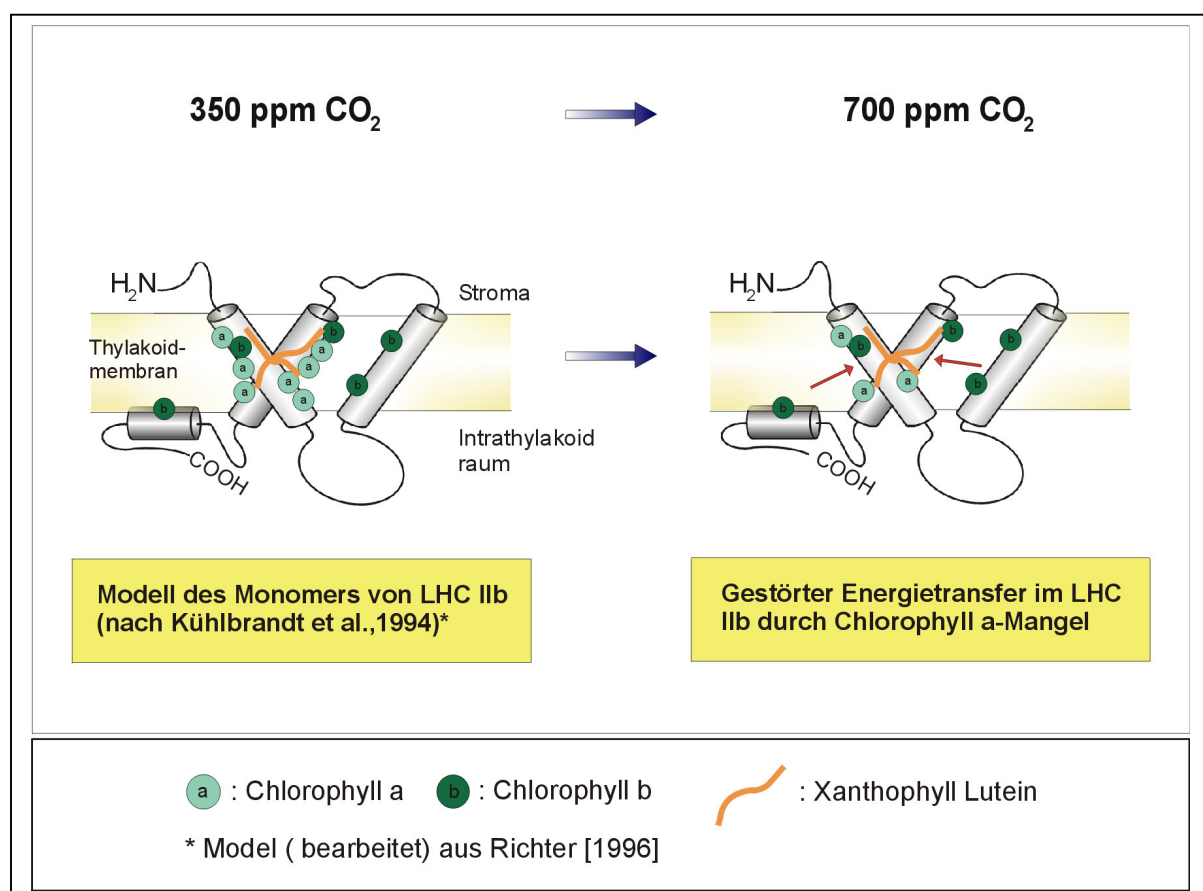


Die Chlorophyll a-Verminderung kann einerseits über das gesamte Photosystem verteilt sein, d.h. dass der Chlorophyll a-Mangel im LHC **und** in der Core-Antenne von PS II auftreten kann, wie Abb 4.4 A zeigt. Andererseits ist es durchaus denkbar, dass nur der LHC von PS II ein Chlorophyll a-Defizit aufweist, wie Abb 4.4 B zeigt. Möglich ist aber auch, dass nur der

äußere Bereich des Lichtsammel-Antennen-Komplexes eine Chlorophyll a-Verminderung hat (siehe Abb 4.4 C). Die letzte Möglichkeit wäre die, dass nur in der sogenannten Core-Antenne nicht alle Bindungsstellen für Chlorophyll a besetzt sind, wie Abb 4.4 D zeigen möchte. Welche dieser Möglichkeiten zutrifft bleibt offen. Dies bedarf weiterer biochemischer Untersuchungen.

Welche Auswirkungen ein solcher Chlorophyll a-Mangel für den Energietransfer haben kann, zeigt die folgende Abbildung 4.5 anhand eines Modells des Monomers von LHC IIb. Dies gilt für alle Pigment-bundenen Proteine des Photosyntheseapparats.

Abbildung 4.5 Chlorophyll a-Mangel am Beispiel eines Modells des Monomers von LHC IIb.



Der Energietransfer ist eine sehr schnelle ($< 3 \times 10^{-11}$ sec.) und praktisch verlustfreie Übertragung der Anregungsenergie von einem primär durch ein Photon angeregtes Pigmentmolekül über ein Kollektiv von Pigmenten (Chlorophylle und Carotinoide im LHC und in der Core-Antenne) zum Reaktionszentrum (Chlorophyll a-Molekül) im PS I und PS II. Als physikalische Grundlage des Energietransfer gilt der Resonanztransfer (induktive Resonanz). Bei der Rückkehr des primär angeregten Elektrons im absorbierenden „Sensibilisatormolekül“ S (Chlorophyll oder Carotinoid) aus dem ersten Singulettzustand in den Grundzustand wird die freigewordene Energie genutzt, um ein Elektron im benachbarten

„Akzeptormolekül“ **A** (dies ist wiederum ein Chlorophyll oder Carotinoid) auf den ersten Singulettzustand an zu heben. Das oszillierende elektromagnetische Feld des primär angeregten Elektrons in **S** bringt ein Elektron in **A** zum Schwingen. Dies ist nur möglich, wenn die beiden den Molekülen **S** und **A** zugeordneten Gesamtheiten von Oszillatoren sich in ihren Eigenfrequenzen überlappen **und wenn der räumliche Abstand zwischen S und A kleiner als 10 nm ist** [Borriss, Greifswald und Libbert, 1985].

Wenn nun nicht alle Bindungsstellen für Chlorophyll a im Monomer von LHC IIb der *CO₂-Pflanze* von JWB besetzt sind, so entstehen unter Umständen Unterbrechungen in der Chlorophyllmatrix. Da der Abstand dann zwischen den noch vorhandenen Chlorophyll-Molekülen u. U. größer als 10 nm ist, wird der Elektronentransfer gestört. Er könnte nicht mehr vollständig ablaufen.

Bei der chlorophyllarmen Mutante Su/su zeigt der Vergleich der Markierung ausgewählter Polypeptide in den Thylakoidmembranen der *CO₂-Pflanze* gegenüber den Kontrollpflanzen eine deutliche Veränderung der quantitativen Verteilung dieser Polypeptide (siehe Abb. 3.22 auf Seite 106). Im Photosyntheseapparat der *CO₂-Anzucht* von Su/su steigt der LHC stark an, während die Core-Komplexe von PS I und PS II deutlich abnehmen. Dies bedeutet, dass die photosynthetische Einheit (PS I / II) in der *CO₂-Pflanze* von Su/su stark zunimmt. Daher nimmt das Chlorophyll a/b Verhältnis in den *CO₂-Thylakoidmembranen* gegenüber der Kontrollpräparation deutlich sichtbar ab (siehe Abb 4.1 B auf Seite 150 und Tabelle 3.3 auf Seite 68). Die chlorophyllarme Mutante hat gegenüber dem Wildtyp JWB eine verkleinerte Lichtantenne [Schmid und Gaffron, 1967], die unter dem Einfluß der *CO₂-Anzucht* dann etwas (in Richtung auf den Zustand des Wildtyps) vergrößert wird. Die Westernblot-(Immunoblot-) Analyse zeigt noch ein weiteres Ergebnis. So nehmen auch die Markierungen der Cytochrom f-Untereinheit des Cytochrom *b₆f*-Komplexes und der α -Untereinheit des ATP-Synthase Komplexes bei der Thylakoidmembranpräparation der *CO₂-Pflanze* von Su/su sichtbar ab. Im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanze* von Su/su kommt es also zu einer Reduktion des Cytochrom *b₆f*-Komplexes und des ATP-Synthase Komplexes. Dies ist eine Konsequenz aus der großen Abnahme des Proteingehaltes pro mg Chlorophyll bei den *CO₂-Thylakoidmembranen* gegenüber den Kontrollen (siehe Tabelle 3.3 auf Seite 68), denn bei der starken Zunahme an LHC müssen in den Thylakoidmembranen der *CO₂-Pflanze* andere Komponenten des Photosyntheseapparates bei niedrigerem Proteingehalt abnehmen.

Das wichtige Ergebnis der Westernblot-Analyse ist, dass die *CO₂-Anzucht* der beiden Tabakpflanzen JWB und Su/su unter der vorhandenen Lichtintensität in den Klimakammern auf die Lichtantenne wirkt.

4.7

ATP-Gehalt

Bei den beiden Tabakpflanzen JWB und Su/su führt die Anzucht unter einer erhöhten CO_2 -Konzentration von 700 ppm zu einer Verminderung der ATP-Synthase Komplexe im Photosyntheseapparat. Es wurde daher untersucht, ob dies einen Einfluß auf den ATP-Gehalt in isolierten Chloroplasten hat.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen beim Wildtyp JWB, dass der Gehalt an ATP bezogen auf mg Chlorophyll als auch auf mg Protein in den Chloroplasten der CO_2 -Pflanze abnimmt. Dieser Trend setzt sich im Bezug auf mg Thylakoidmembran-Protein deutlich fort. Die Verringerung der ATP-Synthase Komplexe im Photosyntheseapparat der CO_2 -Pflanze von JWB führt also zu einem niedrigeren ATP-Spiegel in den Chloroplasten. Dies mag so aussehen wie wenn das Wachstum der Tabakpflanze JWB unter erhöhtem CO_2 einen negativen Einfluß auf den ATP-Gehalt in den Chloroplasten haben kann. Es ist auch möglich, dass das verstärkte Wachstum der CO_2 -Pflanze zu einem höheren Verbrauch an ATP führt, der letztlich den ATP-Spiegel in den Chloroplasten absinken läßt.

Bei der chlorophyllarmen Mutante Su/su sind die Ergebnisse bezogen auf mg Chloroplasten-Chlorophyll, mg Chloroplasten-Protein und mg Thylakoidmembran-Protein verschieden. Fällt der Gehalt an ATP im Bezug auf mg Chlorophyll in den Chloroplasten der CO_2 -Pflanze von Su/su ab, so steigt der Gehalt an ATP im Bezug auf mg Chloroplasten-Protein und mg Thylakoidmembran-Protein deutlich an. Dieses Ergebnis ist interessant, da der Proteingehalt pro mg Chlorophyll in Chloroplasten- und Thylakoidmembranpräparationen aus der CO_2 -Pflanze von Su/su gegenüber den Kontrollpräparationen deutlich absinkt. Trotz niedrigerem Gehalt an Protein steigt der ATP-Gehalt im Bezug auf mg Protein an. Somit hat das Wachstum der chlorophyllarmen Mutante Su/su unter erhöhtem CO_2 einen positiven Effekt auf den ATP-Gehalt in Chloroplasten. Die Nutzeffektivität (Use-Efficiency) von Stickstoff (N) erhöht sich im Hinblick auf den ATP-Spiegel in den CO_2 -Chloroplasten von Su/su. Eine Steigerung der *Use-Efficiency* von N bei CO_2 -Pflanzen wird auch in der Literatur beschrieben [Conroy und Hocking, 1993; Mitchel et al., 1993].

4.8

Die physiologischen Untersuchungen

Im folgendem wurde die Fluoreszenz von Blättern und isolierten Chloroplasten und die photosynthetische Aktivität von Blattstücken, Chloroplasten, PS II-Membranen und PS I-Komplexen der beiden Tabakpflanzen JWB und der chlorophyllarmen Mutante Su/su und ihrer CO_2 -Pflanzen untersucht.

Wie schon im Ergebnisabschnitt 3.9 auf Seite 111 - 115 ausführlich beschrieben und diskutiert, sind die Veränderungen in der Fluoreszenzkinetik von Blättern und Chloroplasten

der *CO₂-Pflanze* gegenüber den Kontrollen beim Wildtyp JWB eine Konsequenz der Anpassung des Photosyntheseapparates an eine erhöhte CO₂-Atmosphäre von 700 ppm. Diese beruhen auf einer schlechteren Kopplung der beiden Photosysteme (I & II) im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanzen*. Ebenso hat die starke Zunahme des Plastochinonpools in den CO₂-Thylakoidmembranen einen Einfluß auf die Fluoreszenzkinetik der *CO₂-Blätter*. Auch die strukturelle Veränderung des Photosyntheseapparates im Bereich des PS II als auch die Abnahme der ATP-Synthase Komplexe im Photosyntheseapparat in den *CO₂-Pflanzen* von JWB wirkt sich auf die Fluoreszenzkinetik von Blättern und Chloroplasten aus.

Obwohl die photosynthetische Aktivität von Blattstücken, gemessen mittels Warburg-Manometrie, zwischen den Kontroll- und CO₂-Pflanzen von JWB keine Unterschiede aufweist (siehe Abb. 3.27 auf Seite 120), so zeigen die photosynthetischen Aktivitäten der verschiedenen Teilreaktionen der Lichtreaktion isolierter Chloroplasten, PS II-Membranen und PS I-Komplexe, deren Aktivität mit der Clark-Sauerstoff-Elektrode als auch mit der *P700*-Blitzlichtabsorptionsspektroskopie gemessen wurde, zwischen den Kontroll- und CO₂-Pflanzen große Unterschiede auf.

So zeigen die Kurvenverläufe der Teilreaktionen PS II-Reaktion ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy}$) und die PS I-Reaktion (Ascorbat/DCPIP \rightarrow MV) in Abhängigkeit von der eingesetzten Lichtintensität in isolierten Chloroplasten, PS II-Membranen und PS I-Komplexen bei den *CO₂-Präparationen* gegenüber den Kontrollpräparationen einen Verlauf, der für Pflanzen typisch ist, die an höhere Lichtintensitäten adaptiert sind (Abschnitt 3.10.6 auf Seite 138 - 141). Die Messung der photosynthetischen Aktivität unter lichtgesättigter Bedingungen isolierter PS I-Komplexe mittels der Clark-Elektrode sowie mittels der *P700*-Blitzlichtabsorptionsspektroskopie bestätigen dies (siehe Tabelle 3.16 im Abschnitt 3.10.4 auf Seite 131). Die Ergebnisse sind die Konsequenz der Zunahme der Core-Komplexe von PS I und PS II im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanzen* von JWB.

Die Ergebnisse der Messung der Aktivität der photosynthetischen Elektronentransportkette ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$ (Clark-Sauerstoff-Elektrode), $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NADP}^+$ (*P700*-Blitzlichtabsorptionsspektroskopie)) zwischen den Kontroll- und CO₂-Pflanzen von JWB fallen jedoch unerwartet aus. Generell liegt die Aktivität der photosynthetischen Elektronentransportkette der CO₂-Chloroplasten unter denen der Kontrollpräparationen (Tab. 3.13 auf Seite 123; Tab. 3.15 auf Seite 129 und Abb. 3.33 auf Seite 139). Bei den Untersuchungen zur Aktivität der photosynthetischen Elektronentransportkette in Abhängigkeit von der eingesetzten Lichtintensität (Ergebnisabschnitt 3.10.6, Abb. 3.33 auf Seite 139) hätte man eigentlich bei den *CO₂-Chloroplasten* einen ähnlichen Kurvenverlauf der Aktivität erwartet, wie man ihn bei den beiden anderen Teilreaktionen (PS II-Reaktion und PS I-Reaktion in Abb.3.32 auf Seite 138) in den *CO₂-Chloroplasten* gefunden hat. Dies ist jedoch nicht der Fall. Es scheint in den *CO₂-Chloroplasten* von JWB eine Störung in der photosynthetischen Elektronentransportkette eingetreten zu sein. Das Wachstum der Tabakpflanze JWB unter erhöhtem CO₂ führt im Photosyntheseapparat zu einer schlechteren Kopplung der beiden Photosysteme (PS I & PS II). Die Kapazität der

Elektronentransportkette im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanzen* erreicht nicht die maximal mögliche Aktivität der beiden Photosysteme (PS I & PS II). Dies könnte ein Grund sein, warum der Vergleich der photosynthetischen Aktivität von Blattstücken, die mit der Warburg-Manometrie gemessen wurden, zwischen den Kontroll- und *CO₂-Pflanzen* von JWB keine Unterschiede aufzeigt. In diesem Zusammenhang ist das Ergebnis der Untersuchung des Einflusses der Konzentration an DCPIP auf die Aktivität der PS I-Reaktion (Ascorbat/DCPIP → MV) isolierter Chloroplasten aus JWB zu erwähnen (Abb. 3.30 A auf Seite 134 im Ergebnisteil 3.10.5). Während die Kontroll-Chloroplasten eine typische Sättigungskurve der PS I-Reaktion im Bezug auf die Konzentration an DCPIP im Meßansatz zeigen, verläuft der Kurvenverlauf bei den *CO₂-Chloroplasten* sigmoid. Isolierte PS I-Komplexe aus den Kontroll- und *CO₂-Pflanzen* von JWB zeigen eine typische Sättigungskurve auf, wenn man die Aktivität der PS I-Reaktion im Bezug auf die Konzentration an DCPIP im Meßansatz unter lichtgesättigter Bedingung misst (siehe Abb. 3.31 auf Seite 135). Eine Veränderung des K_m -Wertes für DCPIP zwischen den PS I-Präparationen der Kontroll- und *CO₂-Pflanzen* wurde nicht beobachtet. Dies bedeutet, dass das veränderte Verhalten der PS I-Reaktion in isolierten Chloroplasten der *CO₂-Pflanze* von JWB gegenüber den Kontrollanzuchten bei Bezug auf die DCPIP-Konzentration nicht auf einer strukturellen Veränderung im Bereich der Donorseite von PS I zu begründen ist. Dennoch ist es möglich, dass im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanze* von JWB im Bereich von Photosystem I (PS I) eine andere Redoxpotentialabhängigkeit vorliegt. Möglicherweise liegt die Ursache für die geringere Kapazität des photosynthetischen Elektronentransportes in den *CO₂-Chloroplasten* gegenüber den Kontrollpräparationen in diesem Bereich des Photosyntheseapparates begründet.

Die Anzucht des Wildtyps JWB unter einer erhöhten *CO₂*-Konzentration von 700 ppm führt zu einer Abnahme der ATP-Synthase-Komplexe im Photosyntheseapparat. Dies hat zur Folge, dass die prozentuale Stimulierung der verschiedenen Teilreaktionen (PS II-Reaktion, PS I-Reaktion und die gesamte photosynthetische Elektronentransportkette) der Lichtreaktion bei den *CO₂-Chloroplasten* durch Entkopplung der Photophosphorylierung von der Lichtreaktion deutlich stärker zunimmt (Tabelle 3.14 auf Seite 123 im Ergebnisteil 3.10.2). Dabei wird die PS II-Reaktion gegenüber den beiden anderen Teileaktionen in den *CO₂-Chloroplasten* von JWB am stärksten stimuliert. Daraus kann gefolgert werden, dass im Photosyntheseapparat der *CO₂-Pflanzen* im Bereich vom Photosystem II eine größere Abnahme an ATP-Synthase-Komplexe stattgefunden hat als in den anderen Bereichen der Thylakoidmembran.

Wird der Einfluss der Temperatur auf die photosynthetische Aktivität in isolierten Chloroplasten und PS II-Membranen der Kontroll- und *CO₂-Pflanzen* von JWB gemessen (siehe Abb. 3.38 auf Seite 145 und Abb. 3.39 auf Seite 146), so zeigen die verschiedenen Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports in den Chloroplasten und PS II-Membranen der *CO₂-Pflanzen* gegenüber den Kontrollen eine Verschiebung der Temperaturoptima um + 4° bis 5° Celsius. Obwohl die Temperatur im Wachstumsexperiment nicht erhöht war, scheint es so zu sein, dass die *CO₂-Pflanzen* bei Erhöhung der *CO₂*-Konzentration auf 700 ppm eine Erhöhung der Temperatur „erwarten“. Die Analyse der

qualitativen und quantitativen Bestimmung der Fettsäuren im Fettsäuregemisch aus isolierten Thylakoidmembranen der Kontroll- und CO_2 -Pflanzen hat gezeigt, dass das Wachstum der Tabakpflanze unter erhöhtem CO_2 letztlich keinen großen Einfluß auf die Zusammensetzung der Fettsäuren in den Thylakoidmembranen und somit auf die Membranfluidität hat (Ergebnisabschnitt 3.5.3 Tabelle 3.12 auf Seite 91).

Bei der chlorophyllarmen Mutante Su/su führt die Anzucht unter erhöhtem CO_2 zu einem Anstieg des LHC im Photosyntheseapparat. Gleichzeitig sinkt die Menge an Core-Komplexen von PS I und PS II in den Thylakoidmembranen der CO_2 -Pflanze ab. Dies hat einen Einfluß auf die Ergebnisse der physiologischen Untersuchungen bei den CO_2 -Pflanzen von Su/su. So zeigt die Fluoreszenzinduktionskurve von Blättern der CO_2 -Pflanze eine sehr strukturierte Kinetik, während die Kinetik der Fluoreszenz bei den Kontrollblättern kaum ausgeprägt ist (Abb. 3.25 A auf Seite 116). Auch bei isolierten Chloroplasten der CO_2 -Pflanze ist im Gegensatz zu den Kontrollen eine deutliche Kinetik in der Fluoreszenzinduktionskurve zu beobachten (Abb. 3.26 A auf Seite 118). Bedingt durch den starken Anstieg des LHC im Photosyntheseapparat der CO_2 -Pflanzen liegt die maximale Fluoreszenz bei den Blättern und Chloroplastenpräparationen deutlich über der der Kontrollen (Abb. 3.25 B auf Seite 116 und Abb. 3.26 B auf Seite 118).

Das Ergebnis der Messung der photosynthetischen Aktivität von Blattstücken, gemessen mittels Warburg-Manometrie, der Kontroll- und CO_2 -Pflanzen von Su/su zeigt, dass die strukturelle Veränderung im Photosyntheseapparat der CO_2 -Pflanzen bei den CO_2 -Blättern gegenüber den Kontrollblättern innerhalb der vorgegebenen Lichtintensität von 0 bis $300 \mu\text{E} / \text{m}^2 \times \text{sec.}$ zu deutlich höheren Sauerstoffentwicklungsraten führt (Abb. 3.28 im Ergebnisabschnitt 3.10.1 auf Seite 121). Dem entsprechend zeigen die Kurvenverläufe der verschiedenen Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports (Lichtreaktion) in den isolierten Chloroplasten, PS II-Membranen und PS I-Komplexen, - wenn man die photosynthetische Aktivität der Teilreaktionen (PS II-Reaktion, PS I-Reaktion und Elektronentransportkette) in der Clark-Sauerstoff-Elektrode in Abhängigkeit von der Lichtintensität misst, bei den CO_2 -Präparationen gegenüber den Kontrollen einen Sättigungsverlauf auf (Ergebnisabschnitt 3.10.6 auf Seite 141 bis Seite 144). Unter der höchsten Beleuchtungsintensität erreichen die Aktivitäten der verschiedenen Teilreaktionen bei den Kontrollpräparationen gegenüber den Präparationen aus der CO_2 -Pflanze von Su/su deutlich größere Raten. Auch in der P700-Blitzlichtabsorptionsspektroskopie, bei der die Proben mit lichtgesättigenden Blitzen belichtet werden, liegen die P700 Signale der Chloroplasten und PS I-Komplexe aus der CO_2 -Pflanze erwartungsgemäß deutlich unter denen der Kontrollen (Tabelle 3.15 auf Seite 129 im Abschnitt 3.10.3 und Tabelle 3.16 auf Seite 131 im Ergebnisabschnitt 3.10.4).

Die Anzucht der chlorophyllarmen Mutante Su/su unter erhöhtem CO_2 führt zu einer Reduktion der ATP-Synthase-Komplexe in den Thylakoidmembranen. Das Ergebnis des Vergleiches der prozentualen Stimulierung der verschiedenen Teilreaktionen der Lichtreaktion durch die Entkopplung der Photophosphorylierung vom photosynthetischen

Elektronentransport in den Chloroplasten der Kontroll- und CO₂-Pflanze (Tabelle 3.14 auf Seite 123) läßt den Schluß zu, dass im Bereich von PS II des Photosyntheseapparates das Verhältnis ATP-Synthase-Komplexe zu PS II in den *CO₂-Chloroplasten* unverändert geblieben ist. Denn die prozentuale Stimulierung fällt bei der PS II-Reaktion (H₂O → FeCy) in den Chloroplasten der Kontroll- und CO₂-Pflanzen gleichhoch aus. Im Bereich von PS I nimmt das Verhältnis ATP-Synthase-Komplexe zu PS I in den *CO₂-Chloroplasten* von Su/su dagegen ab. Damit ist gemeint, dass es bei den *CO₂-Chloroplasten* im Bereich des PS I es zu einer stärkeren Verminderung an ATP-Synthase-Komplexe gekommen ist als im Bereich des PS II.

Das Ergebnis der Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf die photosynthetische Aktivität in Chloroplasten und PS II-Membranen zeigt, dass die Anzucht der chlorophyllarmen Mutante Su/su unter erhöhtem CO₂ (700 ppm) zu einer Verschiebung des Temperaturoptima der verschiedenen Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports in isolierten Chloroplasten und PS II-Membranen hin zu höheren Temperaturen führt (Seite 147 - 148). Wie beim Wildtyp JWB scheint auch die chlorophyllarme Mutante Su/su bei Erhöhung der CO₂-Konzentration in der Atmosphäre eine Erhöhung der Temperatur zu „erwarten“.

Die physiologischen Untersuchungen bestätigen also die Umgestaltung des Photosyntheseapparates in den CO₂-Pflanzen der chlorophyllarmen Mutante Su/su.

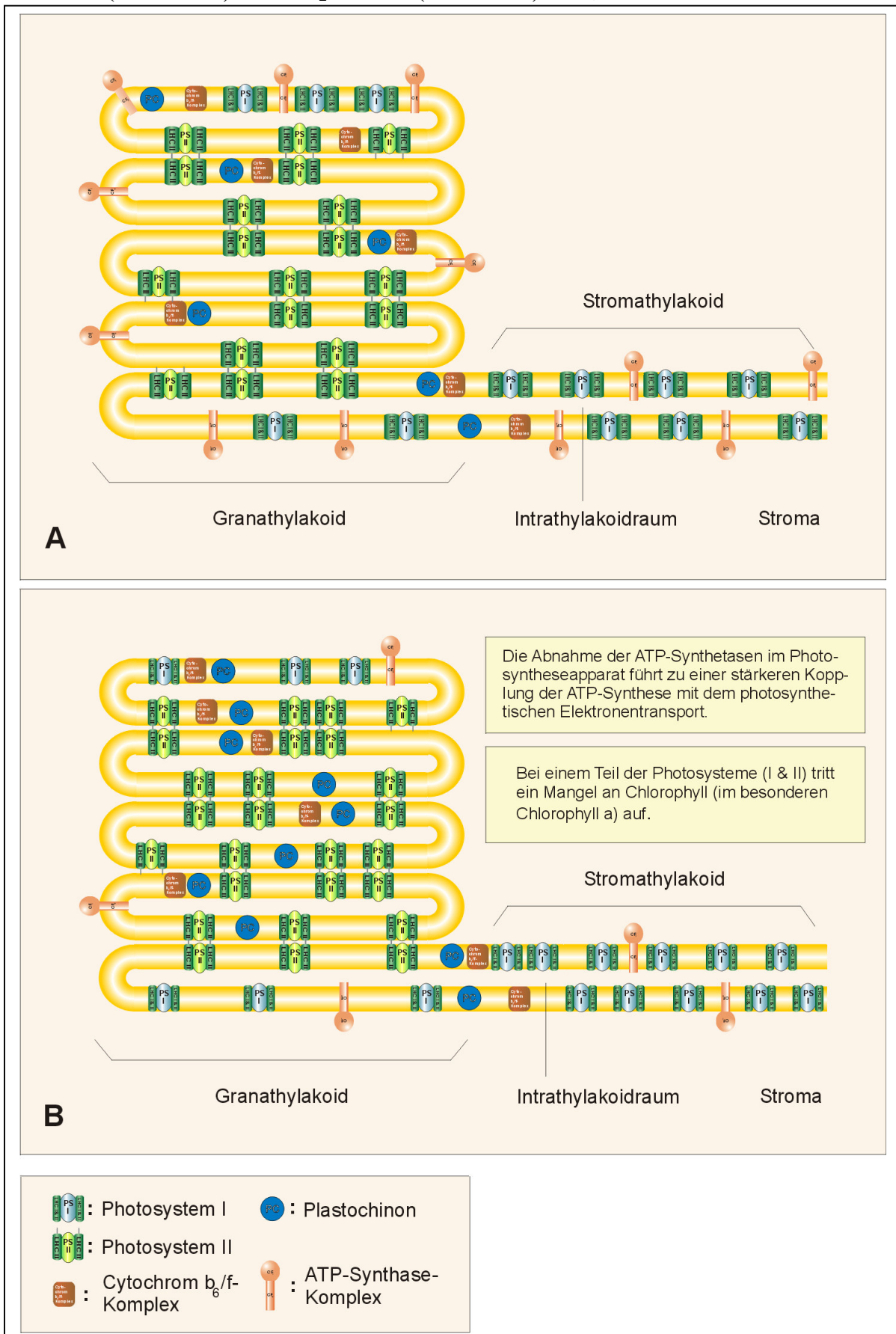
Wenn man bedenkt, dass der Proteingehalt pro mg Chlorophyll in den Thylakoidmembranen der *CO₂-Pflanze* von Su/su gegenüber den Kontrollanzuchten stark absinkt, so kann man im Bezug auf die Klimabedingungen in der Klimakammer von einer Erhöhung der *Use-Efficiency* von Stickstoff im Photosyntheseapparat der *CO₂-Anzuchten* von Su/su ausgehen. So zeigen bei einer mittleren Lichtintensität von 140 µE / m² x sec. in den Klimakammern die Blätter der *CO₂-Pflanzen* gegenüber den Kontrollpflanzen deutlich höhere Sauerstoffentwicklungsraten (Abb. 3.28 im Ergebnisabschnitt 3.10.1 auf Seite 121).

4.9 Modellvorstellung zur Veränderungen im Photosyntheseapparat bei Wachstum unter erhöhtem CO₂.

In diesem Abschnitt werden die strukturellen Veränderungen im Photosyntheseapparat bei Wachstum der beiden Tabakpflanzen JWB und Su/su unter erhöhtem CO₂ (700 ppm) anhand von Modellvorstellungen zusammengefasst.

Die folgende Abbildung 4.6 zeigt die Veränderungen im Photosyntheseapparat des Wildtyps JWB zwischen den Kontroll- und CO₂-Pflanzen.

Abbildung 4.6 Modell zur Veränderung des Photosyntheseapparates zwischen der Kontroll- (Abb. 4.6 A) und CO₂-Pflanze (Abb. 4.6 B) von JWB.

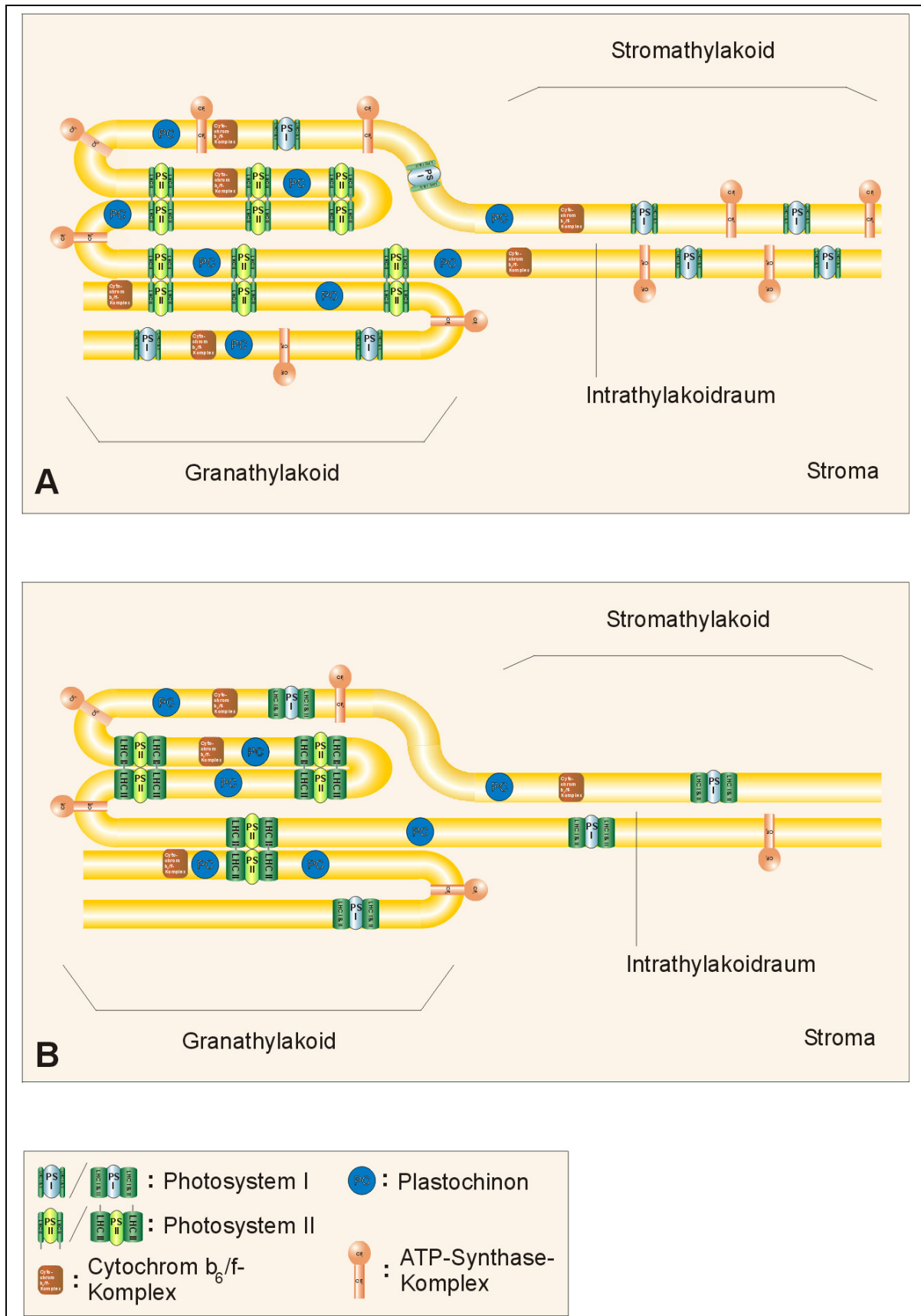


Die Abb. 4.6 A & B zeigt den Querschnitt durch ein Granum an das sich ein Stromthylakoid anschließt. Die Abb. 4.6 A zeigt das Model des Photosyntheseapparates aus der Kontrollanzucht und Abb. 4.6 B das der CO_2 -Anzucht.

Die Anzucht von JWB unter erhöhtem CO_2 führt zu einem Anstieg der PS II-Core-Komplexe in den Granathylakoiden. Dabei nimmt statistisch der Anteil an LHC II am PS II-Core-Komplex ab. Die Menge an Plastochinon nimmt im Photosyntheseapparat der CO_2 -Anzucht stark zu. Die Zahl der Cytochrom *b₆f*-Komplexe bleibt unverändert. Der Anteil der ATP-Synthase-Komplexe nimmt im Photosyntheseapparat der CO_2 -Pflanze von JWB stark ab, wobei die Reduktion der ATP-Synthase-Komplexe in den Granathylakoiden größer ist als in den Stromathylakoiden. Die Zahl der PS I-Core-Komplexe nimmt in den Stromathylakoiden der CO_2 -Pflanze deutlich zu, wobei sich der Anteil des LHC pro PS I-Core-Komplex verringert.

Die Abb. 4.7 zeigt die strukturelle Umgestaltung des Photosyntheseapparates der Mutante Su/su zwischen den Kontroll- und CO_2 -Pflanzen.

Abbildung 4.7 Modell zur Veränderung des Photosyntheseapparates zwischen der Kontroll- (Abb. 4.7 A) und CO₂-Pflanze (Abb. 4.7 B) von Su/su.



Das Wachstum der chlorophyllarmen Mutante Su/su unter einer erhöhten CO₂-Atmosphäre von 700 ppm führt zu einer Reduktion der PS II-Core-Komplexe im Granabereich des Photosyntheseapparates. Gleichzeitig nimmt die Größe des LHC deutlich zu. Die Menge an Plastochinon bleibt praktisch unverändert, nimmt nur leicht ab. Der Gehalt an Cytochrom *b₆/f*-Komplexen nimmt im Photosyntheseapparat der CO₂-Pflanze gegenüber der Kontrolle ab. In der CO₂-Pflanze von Su/su kommt es zu einer Verminderung der ATP-Synthase-Komplexe, wobei die Reduktion im Stromabereich größer ausfällt. Die Anzucht der Mutante Su/su unter erhöhtem CO₂ führt im Stromabereich der Thylakoidmembran zu einem deutlichen Abfall der Zahl der PS I-Core-Komplexe. Die Größe an LHC nimmt pro PS I-Core-Komplex im Photosyntheseapparat der CO₂-Pflanze zu.

4.10 **Schlußfolgerung**

Im Forschungsansatz wurde die Frage aufgestellt, ob es bei den terrestrischen Pflanzen (normal grün ausgebildeten Pflanzen) eine durch die bisherige Evolution bedingte, wie auch immer geartete Kopplung (genetischer Natur ?) zwischen der CO₂-Konzentration und der Lichtintensität gibt. Denn wenn man die klimatischen Verhältnisse der letzten 2,5 Millionen Jahre mit den vorhergehenden 460 Millionen Jahre vergleicht, so zeigt sich, dass die terrestrischen Pflanzen (deren Evolution) überwiegend unter höheren CO₂-Konzentrationen, unter höheren Temperaturen und unter stärkeren Lichtintensitäten aufwuchsen.

Bei der normal grün ausgebildeten Tabakpflanze JWB führt die Anzucht unter erhöhtem CO₂ zu einer Verkleinerung der photosynthetischen Einheit. Dies stellt eine Adaption an erhöhte Lichtintensität dar. Obwohl der LHC im Photosyntheseapparat des Wildtyps JWB bei den CO₂-Pflanzen nicht verkleinert ist, steigt der Anteil der Core-Komplexe von PS I und PS II in den CO₂-Thylakoidmembranen von JWB an. Dass der LHC nicht reduziert wurde, mag an der niedrigen Lichtintensität in der Klimakammer liegen. Statistisch nimmt der Anteil an LHC pro Core-Komplex von PS I und PS II im Photosyntheseapparat der CO₂-Pflanzen ab. Dieser Befund kann im Sinne des Forschungsansatzes so interpretiert werden, dass die Anzucht der Tabakpflanze JWB unter erhöhtem CO₂ zu einer Kopplung zwischen erhöhtem CO₂ und einer zu erwartenden Erhöhung der Lichtintensität bei den CO₂-Pflanzen führt. Auch das Ergebnis der Untersuchung des Plastochinongehaltes im Lipidextrakt isolierter Thylakoidmembranen von Kontroll- und CO₂-Pflanzen zeigt, dass der Plastochinongehalt in den CO₂-Thylakoidmembranen deutlich ansteigt. Dieses Ergebnis läßt ebenfalls den Schluß zu, dass die CO₂-Pflanzen eine höhere Lichtintensität erwarten.

Interessant ist jedoch, dass das Chlorophyll a/b Verhältnis von Chloroplasten, Thylakoidmembranen, PS II-Membranen und PS I-Komplexen bei den Kontroll- und CO₂-Pflanzen von JWB unverändert geblieben ist. Normalerweise hätte man eine Erhöhung des Chlorophyll a/b Verhältnisses bei den verschiedenen Präparationen der CO₂-Pflanze messen müssen. Unerwartet ist auch das Ergebnis der Verteilung bestimmter Polypeptide des Photosyntheseapparates mittels des Western-Blot-Verfahrens. Pro mg Chlorophyll

Thylakoidmembranen bleibt der Gehalt an LHC bei den *CO₂-Pflanzen* konstant, während der Anteil der getesteten Core-Peptide von PS I und PS II in den Thylakoidmembranen ansteigt. Daraus kann gefolgert werden, dass ein Teil der Pigment-bindenden Proteine von PS I und PS II weniger oder kein Chlorophyll a gebunden haben. Dies führt funktionell zu einer Reduktion des Lichtsammel-Mechanismus, da der Energietransfer im Licht-Sammel-Antennen-Komplex des Photosyntheseapparates der *CO₂-Pflanzen* gestört ist

Die Ergebnisse des Einflusses der Temperatur auf die verschiedenen Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports in isolierten Chloroplasten und PS II-Membranen von JWB zeigen, dass die Temperaturoptima bei den *CO₂-Pflanzen* hin zu höheren Temperaturen verschoben sind. Die Tabakpflanze JWB „erwartet“ bei Erhöhung der CO₂-Konzentration auf 700 ppm auch eine Erhöhung der Temperatur.

Bei der chlorophyllarmen Mutante Su/su führt das Wachstum unter erhöhtem CO₂ zu einem Anstieg des LHC und zu einer gleichzeitiger Reduktion der Core-Komplexe von PS I und PS II im Photosyntheseapparat. Pro Core-Komplex von PS I und PS II nimmt der LHC zu. Die photosynthetische Einheit wird bei den *CO₂-Pflanzen* von Su/su also vergrößert. Die an hohe Lichtintensität adaptierte Pflanze verhält sich also ganz anders als der Wildtyp JWB. Dies mag an der niedrigen Lichtintensität in den Klimakammern liegen, die für die Mutante Su/su suboptimal ist. Die chlorophyllarme Mutante Su/su baut bei Anzucht unter erhöhtem CO₂ ihren Photosyntheseapparat so um, dass eine verbesserte Lichtaufnahme unter den Lichtbedingungen der Klimakammern stattfinden kann. Sie ist nun in der Lage den erhöhten Eintrag an Kohlenstoff besser verarbeiten zu können, da die photosynthetische Aktivität durch die Umgestaltung des Photosyntheseapparates in den *CO₂-Pflanzen* unter der gegebenen Lichtintensität in den Klimakammern deutlich ansteigt. Wie beim Wildtyp JWB „erwartet“ die chlorophyllarme Mutante Su/su bei Erhöhung der CO₂-Konzentration eine Erhöhung der Temperatur.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Anpassungen des Photosyntheseapparates der beiden Tabakpflanzen *Nicotiana tabacum* var. John William's Broadleaf (JWB) und der Aureamutante Su/su an eine erhöhte CO₂-Atmosphäre von 700 ppm untersucht.

Bei beiden Tabakpflanzen führt die Anzucht unter erhöhtem CO₂ zu einem verstärktem Wachstum der Pflanzen.

Bei dem Wildtyp JWB führt die Anzucht unter erhöhtem CO₂ zu einer Veränderung des Photosyntheseapparates. Der Anteil der Core-Peptide von Photosystem I & II steigt an, während der Anteil des LHC praktisch unverändert bleibt. Demgegenüber bleibt das Chlorophyll a/b Verhältnis gegenüber den Kontrollen unverändert. Statistisch gesehen, nimmt also der Anteil an LHC pro Reaktionszentrum von PS I & II ab. Somit wird die photosynthetische Einheit bei den CO₂-Pflanzen von JWB kleiner. Es kommt also zu einer Abnahme von Chlorophyll a im Photosystem I & II. Ein Teil der Chlorophyll-bindenden Proteine des Photosyntheseapparates von JWB haben weniger oder vermutlich überhaupt kein Chlorophyll a gebunden. Dies wird am Beispiel von PS I besonders deutlich. Pro mg Chlorophyll steigt der Proteingehalt in den CO₂ PS I-Komplexen gegenüber den Kontrollen an. Das Mehr an Protein ist im PS I der CO₂-Pflanzen von JWB in die Core-Peptide eingebaut. Das Chlorophyll a/b Verhältnis ist aber unverändert geblieben. Der Anteil an LHC im PS I ist ebenfalls gleich geblieben. Hieraus ergibt sich, dass ein Teil der Chlorophyll-bindenden Proteine im PS I der CO₂-Pflanzen weniger Chlorophyll a gebunden haben muß.

Der Anteil der α -Untereinheit der ATP-Synthase-Komplexe nimmt im Photosyntheseapparat der CO₂-Pflanzen deutlich ab. Das bedeutet, dass die Anzahl der ATP-Synthase-Komplexe in den Chloroplasten der CO₂-Pflanzen von JWB abgenommen hat. Dies führt zu einer stärkeren Kopplung der ATP-Synthase mit dem photosynthetischen Elektronentransport. Der ATP-Gehalt nimmt in den Chloroplasten der CO₂-Pflanze pro mg Chlorophyll oder pro mg Protein ab. Demgegenüber steigt der Plastochinongehalt im Lipidextrakt isolierter Thylakoidmembranen aus den CO₂-Pflanzen von JWB gegenüber den Kontrollen um den Faktor 1,7 an. Die Analyse der Carotinoidverteilung isolierter Thylakoidmembranen zeigt bei den CO₂-Pflanzen einen Anstieg des β -Carotin / Lutein Verhältnisses um 20 % an. Auch dies bestätigt eine Verschiebung des Verhältnisses der photosynthetischen Reaktionszentren von PS I & PS II zu LHC in Richtung der Reaktionszentren.

Die physiologischen Untersuchungen zeigen, dass die Fluoreszenzinduktionskurven der Blätter und Chloroplasten der CO₂-Pflanze von JWB Veränderungen aufweisen, die eine Konsequenz der Anpassung des Photosyntheseapparates an die erhöhte CO₂-Atmosphäre darstellen. Im Mittel zeigen die CO₂-Chloroplasten von JWB eine stärkere prozentuale Stimulierung der verschiedenen Teilreaktionen des Elektronentransports durch die Entkopplung des photosynthetischen Elektronentransports von der Photophosphorylierung, wobei die PS II-Reaktion (H₂O → FeCy) die höchste prozentuale Stimulierung aufweist. Erwartungsgemäß zeigen isolierte PS I-Komplexe der CO₂-Pflanzen unter lichtgesättigter Bedingung höhere Aktivitäten sowie höhere P700-Signale. Das Chlorophyll / P700 Verhältnis fällt bei den CO₂ PS I-Komplexen deutlich kleiner aus. Die Kurvenverläufe der beiden Teilreaktionen von PS II (H₂O → FeCy) und PS I (Ascorbat/DCPIP → MV) zeigen in Abhängigkeit von der Lichtintensität in isolierten Chloroplasten und PS II-Membranen der CO₂-Pflanzen einen Verlauf, der für Pflanzen typisch ist, die an höhere Lichtintensitäten angepasst sind. Die Anzucht der Tabakpflanze JWB unter erhöhtem CO₂ führt im Photosyntheseapparat zu einer schlechteren Verbindung der beiden Photosysteme (PS I & PS II). Die geringere Kapazität des photosynthetischen Elektronentransports in den CO₂-Chloroplasten kann auf einer veränderten Redoxpotentialabhängigkeit im Bereich des Photosystems I des Photosyntheseapparates beruhen. Die verschiedenen Teilreaktionen des

photosynthetischen Elektronentransports in den Chloroplasten und PS II-Membranen der *CO₂-Pflanzen* zeigen gegenüber den Kontrollen eine Verschiebung der Temperaturoptima um + 4° bis 5° Celsius hin zu höheren Temperaturen.

Bei der Aurea Mutante Su/su nimmt pro mg Chlorophyll in Thylakoidmembranen der *CO₂-Pflanzen* der LHC deutlich zu, während die Core-Peptide von Photosystem I & II abnehmen. Auch die Menge an Cytochrom b₆/f- und ATP-Synthase-Komplexen nimmt bei den *CO₂-Thylakoidmembranen* ab. Die Anzucht der Mutante Su/su unter erhöhtem CO₂ führt also zu einer Verschiebung des Verhältnisses von photosynthetische Reaktionszentren (I & II) zu LHC in Richtung LHC. Dementsprechend fällt das Chlorophyll a/b Verhältnis bei allen Präparationen (Blätter, Chloroplasten, Thylakoidmembranen, PS II-Membranen und PS I-Komplexen) aus den *CO₂-Pflanzen* gegenüber den Kontrollen kleiner aus. Das β-Carotin / Lutein Verhältnis nimmt im Lipidextrakt isolierter Thylakoidmembranen der *CO₂-Pflanzen* ebenfalls um über 20 % ab. Bei den Chloroplasten-, Thylakoidmembran-, PS II-Membran- und bei den PS I-Präparationen der *CO₂-Pflanzen* verringert sich der Gehalt an Protein pro mg Chlorophyll. Der ATP-Spiegel nimmt in den *CO₂-Chloroplasten* von Su/su pro mg Chlorophyll ab. Pro mg Chloroplasten-Protein und Thylakoidmembran-Protein steigt aber der ATP-Spiegel deutlich an. Damit erhöht sich die *Use-Efficiency* von N im Hinblick auf den ATP-Spiegel in den Chloroplasten der *CO₂-Pflanze* von Su/su.

Die Umgestaltung des Photosyntheseapparates in den CO₂-Pflanzen hat Auswirkungen auf eine Reihe physiologischer Eigenschaften. So zeigen die Blätter und Chloroplasten der *CO₂-Pflanzen* von Su/su gegenüber den Kontrollen wesentlich stärker ausgeprägte Fluoreszenzinduktionskurven. Die photosynthetische Aktivität von Blattstücken der *CO₂-Pflanze* gezogen auf Chlorophyll liegt innerhalb der vorgegebenen Lichtintensitäten (0 bis 300 μE / m² x sec) über der der Kontrollpflanzen. Während die Aktivitäten der verschiedenen Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports bei den Chloroplasten, PS II-Membranen und PS I-Komplexen der Kontrollpflanze von Su/su durch Erhöhung der Lichtintensität in der Clark-Sauerstoff-Elektrode nicht zur Sättigung gebracht werden kann, zeigen die Kurvenverläufe der Aktivitäten der verschiedenen Teilreaktionen bei der *CO₂-Pflanze* einen Sättigungsverlauf auf. Unter sehr hohen Lichtintensitäten erreichen die Aktivitäten der verschiedenen Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports der verschiedenen Präparationen aus den Kontrollanzuchten gegenüber den *CO₂-Pflanzen* bezogen auf das vorhandene Chlorophyll erheblich höhere Werte. Erwartungsgemäß liegen die P700-Signale bei den Chloroplasten und PS I-Komplexen der *CO₂-Pflanze* unter denen der Kontrollanzuchten. Die Entkopplung des photosynthetischen Elektronentransports von der Photophosphorylierung führt bei den Chloroplasten der *CO₂-Pflanzen* zu einer stärkeren Stimulierung der photosynthetischen Elektronentransportkette (H₂O → MV) und der PS I-Reaktion (Ascorbat / DCPIP → MV), während die Stimulierung der PS II-Reaktion (H₂O → FeCy) in etwa der der Kontrollen entspricht. Die verschiedenen Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransports zeigen auch hier bei den Chloroplasten und PS II-Membranen der *CO₂-Pflanzen* eine Verschiebung der Temperaturoptima hin zu höheren Temperaturen.

Bei den beiden Tabakpflanzen JWB und Su/su hat also das Wachstum unter erhöhtem CO₂ einen Effekt auf die Lichtantenne des Photosyntheseapparates.

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Bis-Acrylamid	N,N-Methylen-bis-acrylamid
C	Celsius
Chl.	Chlorophyll
CP1	Chlorophyll-Protein 1
CP43	Chlorophyll-Protein 43
CP47	Chlorophyll-Protein 47
DC-Alufolien	Dünnschicht Chromatography-Alufolien
DCMU	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff
DCPIP	Dichlorphenolindophenol
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetra-acetat
Ext.	Extinktion
FeCy	Kaliumhexacyanoferrat III
g	Erdgravitation
h	Stunde
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
JWB	Nicotiana tabacum var. John William's Broadleaf
kDa	kilo Dalton
LHC	Light-Harvesting Complex
M	Molar
Min.	Minute
mM	milli Molar
ml	milli Liter
MSP	Manganese Stabilizing Protein
MV	Methylviologen
MW	Molekulargewicht
μ E	μ Einstein
μ g	μ Gramm
μ l	μ Liter
NaBr	Natriumbromid
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
RP	Reversed Phase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	Sekunde

Temed	N,N,N,N-Tetramethyl-äthylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volume per Volume
w/v	Weight per Volume
w/w	Weight per Weight

Literaturverzeichnis

Baier A.

<http://www.rrze.uni-erlangen.de:80/docs/FAU/fakulteat/natIII>, Stand: August, 1999

Allen L.H. Jr.

Plant responses to rising carbon dioxide and potential interactions with air pollutants.
J. Environ. Qual. 19, 15 – 34, 1990

Allen J.F.

Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis.
Biochim Biophys Acta 1098, 275 – 335, (1992)

Anderson J.M., Brown J.S., Lam E. und Malkin R.

Chlorophyll b: An integral component of Photosystem I of Higher Plant Chloroplast.
Photochemistry & Photobiology Vol. 38, Nr. 2, 205 – 210, (1983)

Arp W.J.

Effects of source-sink relations on photosynthetic acclimation to CO₂.
Plant Cell Environment 14, 869-875, (1991)

Arp W.J. und Drake B.G.

Increased photosynthetic capacity of *Scirpus olenyi* after 4 years of exposure to elevated CO₂.
Plant Cell Environment 14, 1003-1006, (1991)

Barber J.

Photosynthetic reaction centers: a common link.
TIBS 12, 321 – 326, (1987)

Bassi R. & Simpson D.

Chlorophyll-protein complexes of barley photosystem I.
Eur. J. Biochem. 163, 221 – 230, (1987)

Bassi R., Pineau B., Dainese P. und Marquardt J.

Carotenoid binding proteins of Photosystem II.
Eur. J. Biochem. 212, 297 – 303, (1993)

Bengis C. & Nelson N.

Purification and Properties of the Photosystem I Reaction Center from Chloroplasts.
J. Biol. Chemistry Vol. 250, Nr. 8, 2783 – 2788, (1975)

Bengis C. & Nelson N.

Subunit Structure of Chloroplast Photosystem I Reaction Center.
J. Biol. Chemistry Vol. 252, Nr. 13, 4564 – 4569, (1977)

Berner R.A.

The rise of plants and their effect on weathering and atmospheric CO₂.
Science Vol. 276, 544-546, (1997)

Berthold D.A., Babcock G.T. und Yocum, C.F..

A highly resolved oxygen-evolving photosystem II-preparation from spinach thylakoid membranes. EPR and electron-transport properties.
FEBS Lett. 134, 231 – 234, (1981)

Böger P.

The O₂ / CO₂ cycle: development and atmospheric consequences.
In: San Pietro A (ed) Biochemical and Photosynthetic Aspects of Energy Production, pp 175 - 190. Academic Press, New York, (1980)

Borriss H, Greifswald und Libbert E.

Wörterbücher der Biologie: Pflanzenphysiologie
Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 1985

Borsch P. und Hake J.F.

Klimaschutz (Eine globale Herausforderung)
Landsberg am Lech: Aktuell, 1998

Bowes G.

Growth at elevated CO₂: Photosynthetic responses mediated through Rubisco.
Plant Cell Environ 14, 795 – 806, (1991)

Bowes G.

Facing the inevitable: Plants and increasing atmospheric CO₂.
Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44, 309-332, (1993)

Bowes G.

Photosynthetic Responses to Changing Atmospheric Carbon Dioxide Concentration.
Photosynthesis and the Environment (Neil R. Baker ed.), 387 – 407, Kluwer Acad. Publishers, (1996)

Burk L. und Menser H.A.

A dominant aurea mutation in tobacco.
Tobacco Sci. 8, 101 – 104, (1964)

Campbell N.A

Biologie, Dt. Übers. Hrsg. von Jürgen Markl
Heidelberg; Berlin; Oxford; Spektrum, Akad. Verl., 1997

Chen K., Hu G. und Lenz F.

Effects of CO₂ concentration on strawberry. V. Macronrient uptake and utilization.
J. of Applied Botany 71 (5-6), 189-194, 1997

Conroy J. and Hocking P.

Nitrogen nutrition of C₃ plants at elevated atmospheric CO₂ concentrations.
Physiol Plant 89, 570 – 576, (1993)

Cure J.D. und Acock B.

Crop response to carbon dioxide doubling: A literature survey.
Agric for Meteorol 38, 127-145, 1986

Dädelow J., Radunz A. und Schmid G.H.

Localization of lipids and xanthophylls in inside-out vesicles from thylakoids of *Nicotiana tabacum*.

Plant Lipid Metabolism (Kader J.-C. und Mazliak (eds.)) Kluwer Acad. Publisher, 164 – 169, (1995)

Demming-Adams B., Adams III W.W., Logan B.A. und Verhoeven A.S.

Xanthophyll Cycle-dependent energy Dissipation and flexible Photosystem II efficiency in plants acclimated to light stress.

Aust. J. Plant Physiol. 22, 249 – 260, (1995)

Dickerson R.E.

Cytochrome c and the evolution of energy metabolism.

Am. Sci März, 98-110, (1980)

Eramus D.

The interaction of rising CO₂ and temperatures with water use efficiency

Plant, Cell and Environment 14, 843-852, (1991)

Farrar J.F. und Williams M.L.

The effects of increased atmospheric carbon dioxide and temperature on carbon partitioning, source-sink relations and respiration.

Plant, Cell and Environment, 14, 819 – 830, (1991)

Fish L.E., Kück U. und Bogard L.

Two Partially Homologous Adjacent Light-inducible Maize Chloroplast/Genes

Encoding Polypeptides of the P700 Chlorophyll a-Protein Complex of Photosystem I.

J. Biol. Chem. Vol. 260, Nr. 3, 1413 – 1421, (1985)

Franzen L.G., Frank G., Zuber H. und Rochaix J.D.

Isolation and characterisation of cDNA clones encoding Photosystem I subunits with molecular masses 11,0; 10,0 and 8,4 kDa from *Chlamydomonas reinhardtii*.

Mol. Gen. Genetics 219, 137 – 144, (1989)

Frentzen M. und Heinz E.

Membranlipid-Biosynthese in Chloroplasten.

Biologie unserer Zeit, Nr 6, 178 - 187, (1983)

Futuyma D.J.

Evolutionsbiologie

Birkhäuser Verlag Basel Boston Berlin, 1990

Gast P., Swarthoff T., Ebskamp F.C.R. und Hoff A.J.

Evidence for a New early acceptor in Photosystem I of Plants. An ESR Investigation of Reaction Center Triplet Yield and of the Reduced intermediary Acceptors.

Biochem. et Biophys. Acta 722, 163 – 175, (1983)

Goldbeck J.H., Mehari T., Parret K. und Ikegami J.

Reconstitution of the photosystem I complex from the P700 and F_x-containing reaction center core protein and F_A / F_B polypeptides.

FEBS Lett. Vol. 240, Nr. 1/2, 9 – 14, (1988)

Gothan W. und Weyland H.

Lehrbuch der Paläobotanik, dritte Auflage, 575-601,
BLV Verlagsgesellschaft München Bern Wien 1976

Gounaris K., Chapman D.J., Booth P., Crystall B., Giorg L.B., Klug D.R., Porter G. und Barber J.

Comparison of the D1/D2/cytochrome b559 reaction centre complex of photosystem two isolated by two different methods.
FEBS Lett. 265, 88 – 92, (1990)

Grime J.P.

Vegetation classification by reference to strategies.
Nature 250, 26-31, (1974)

Gulke N.E., Hom J.L., Roberts S.W.

Physiological adjustment of two full-sib families of ponderosa pine to elevated CO₂.
Tree Physiol. 12, 391-401, (1993)

Hall D.O. & Rao K.K.

Photosynthesis, Fith. Edition (1994)

Hankamer B. and James Barber

Structure and Membrane Organisation of Photosystem II in green Plants.
Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48, 641 – 671, (1997)

Hauska G., Schütz M. und Büttner M.

The Cytochrome b₆f complex – Composition, Structure and Function.
Oxygenic Photosynthesis: The Light Reaktionen, 377 – 398, (1996)

Hawker J.S.

Effect of temperature on Lipid, Starch and Enzymes of starch metabolism in Grape, Tomato and Broad Bean leaves.
Phytochemistry Vol. 21, Nr. 1, 33 – 36, (1982)

He P., Radunz A., Bader K.P. und Schmid G.H.

Influence of CO₂ and SO₂ on Growth and Structure of Photosystem II of the Chinese Tung-Oil Tree *Aleurites montana*.
Z. Naturforsch. 51 c, 441-453, (1996)

Heldt H.W. Unter Mitarbeit von Fiona Heldt

Pflanzenbiochemie
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg · Berlin · Oxford, 1996

Henry L.E.A., Mikkelsen J.D. und Lindberg-Moller B.

Pigment and acyl-lipid composition of Photosystem I and II vesicles and of photosynthetic mutants in barley.
Carlsberg Res. Commun. 48, 131 – 148, (1983)

Hinerks J.P., Alfermann K., Radunz A. and Schmid G.H.

Quantitative Changes in Plastoquinone in *Nicotiana tabacum* under the Influence of an Increased CO₂-Partial Pressure of 700 ppm in the Atmosphere. *Advances in Plant Lipid Research*, 445 – 457, Sanchez J., Cerda-Olmedo E. and Martinez-Force (eds.), (1998)

Hipkins M.F. und Baker N.R.

Photosynthesis energy transduktion, - a practical approach, chapter 4 „Spectroscopy“, 90 – 92, (1986)

Hiyama T. und Ke B.

Difference Spectra and Extinction coefficient of P700. *Biochem. et Biophys. Acta* 267, 160 – 171, (1972)

Holleman A.F und Wiberg E.

Lehrbuch der Anorganischen Chemie
Walter de Gruyter & Co. 170 – 171 (1956)

Homann P.H. und Schmid G.H.

Photosynthetic reactions of chloroplasts with unusual structures
Plant Physiol. 42, 1619 – 1632, (1967)

Hoppe P., Heintze A., Riedel A., Creuzer C., Schultz G.

The plastidic 3-phosphoglycerate → acetyl-CoA pathway in barley leaves and its involvement in the synthesis of amino acids, plastidic isoprenoids and fatty acids during chloroplast development.
Planta 190, 253 – 262, (1993)

Höper S.

Untersuchungen zum Einfluß der Stickstoffquelle im Kulturmedium auf den photosynthetischen Elektronentransport bei *Oscillatoria chalybea*.
Diplomarbeit, angefertigt an der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld, Abt. Zellphysiologie (1991)

Houghton J.T., Jenkins G.J., Ephraums J.J., Woodwell G.M.

Climate Change: The IPCC Scientific Assessment.
Cambridge University Press, Cambridge, UK, (1990)

Hundal T., Forsmark-Andree, P., Ernster L., & Andersson B.

Antioxidant activity of reduced plastoquinone in chloroplast thylakoid membranes.
Archives of Biochem. Biophys. 324, 117 – 122, (1995)

Hunt R., Hand D.W., Hannah M.A., und Neal A.M.

Response to CO₂ enrichment in 27 herbaceous species.
Func. Ecol. 5, 410-421, (1991)

Kashino Y., Yamashita M., Okamoto Y., Koike H. and Satoh K.

Mechanismen of electron flow through the Q-B site in photosystem II.3. Effects of the presence of membrane structure on the redox reactions at the Q-B site.
Plant & Cell Physiol. 37(7), 976 – 982, (1996)

Kayser D.

Manometrische Methoden

Keine Verlagsangabe, kein Publikationsdatum angegeben (wahrscheinlich über „B Braun Melsungen: Medizin- und Labortechnik“ erhältlich).

Keeling C.D. und Whorf T.P.

Atmospheric CO₂-modern record Mauna Loa.

In: Trends`91: A Compendium of Data on Global Change Highlights, 14-17, (1992),
Eds: Boden T.A., Sepanski R.J. und Stoss F.W.; Carbon Dioxide Information
Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge

Kimball B.A.

Carbon dioxide and agricultural yield: an assemblage and analysis of 430 prior
observations

Argron J 75, 779-788, (1983)

Kleinzeller A.

Manometrische Methoden.

Gustav-Fischer-Verlag, Jena (1965)

Kruse O., Zheleva D. und Barber J.

Stabilization of photosystem two dimers by phosphorylation: Implication for the
regulation of the turnover of D1 protein.

FEBS Lett. 408, 276 – 280, (1997)

Kühlbrand W., Wang D.N. und Fujiyoshi Y.

Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography.

Nature 367, 614 – 621, (1994)

Laemmli U.K.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage
T4.

Nature 227, 680 – 685, (1970)

Lam E., Ortiz W., Mayfield S. und Malkin R.

Isolation and characterization of a light-harvesting chlorophyll a/b protein complex
with Photostem I.

Plant Physiol. 74, 650 – 655, (1983)

Lawlor D.W.

Photosynthese, 336 – 342

Georg Thieme Verlag (1990)

Lichtentaler H.K.

Die Plastoglobuli von Spinat, ihre Größe, Isolierung und Lipochinonzusammen-
setzung

Protoplasma 68, 65 – 77, (1969)

Lichtentaler H.K. und Pfister K.

Praktikum der Photosynthese (in: Biologische Arbeitsbücher 21), Quelle und Meyer,
Heidelberg, (1978)

Liedtke H. und Marcinek J.

Physische Geographie Deutschlands, zweite Auflage
Justus Perthes Verlag Gotha, Seite 265; 271, (1995)

Malkin R.

On the function of two vitamin K₁ molecules in the PS I electron acceptor complex.
FEBS Lett. 208, Nr. 2, 342 – 346, (1986)

Margulis L.

Origin of Eukaryotic cells.
New Haven (Yale University Press), 1970

Makino A.

Biochemistry of C₃-photosynthesis in high CO₂
J. Plant Res. 107, 79-84, 1994

Makewicz A, Radunz A. and Schmid G.H.

Structural Modifications of the Photosynthetic Apparatus in the Region of
Photosystem I in *Nicotiana tabacum* as a Consequence of an Increased CO₂-Content
of the Atmosphere.
Z. Naturforsch. 50 c, 511 – 520, (1995a)

Makewicz A., Radunz A. und Schmid G.H.

On structural alterations of the CP1- and LHCP1-complexes in *Nicotiana tabacum* in
dependence on the CO₂-content of air.
In: Photosynthesis: from Light to biosphere, Vol III, Kluwer Academic Publishers,
netherlands, 285-288, (1995 b)

Marsho T.V. und Kok B.

P700 Detection
Methods in Enzymology 60, 281 – 289, (1980)

Menke W.

Über die Chloroplasten von *Anthocros punctatus*.
Z. Naturforsch. 16b, 334-336, 1961

Mitchell R.A.C., Mitchell V.J., Driscoll S.P., Franklin J. und Lawor D.W.

Effects of increased CO₂ concentration and temperature on growth and yield of
winter wheat at two levels of nitrogen application.
Plant Cell Environ. 16, 521 – 529, (1993)

Morison J.I.L.

Response of plants to CO₂ under water limited conditions.
Vegetatio 104/105, 193-209, 1993

Mullet J.E., Burke J.J. und Arntzen C.J.

Chorophyll proteins of Photosystem I.
Plant Physiol. 65, 814 – 822, (1980)

Nanba N. und Satoh K.

Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 109 – 112, (1987)

Nechushtai R., Peterson C.C. und Thornber J.P.

Purification and characterization of a light-harvesting chlorophyll a/b of photosystem I of *Lemna gibba*.

Eur. J. Biochem. 164, 345 – 350, (1987)

Poorter H.

Interspecific variation in the growth response of plants to elevated ambient CO₂ concentration.

Vegetatio 104/105, 77 - 97, (1993)

Post W.M., Peng T-H., Emanuel W.R., King A.W., Dale V.H. und DeAngelis D.L.

The global carbon cycle.

Am. Sci. 78, 310-326, (1990)

Quinn P.J. und Williams W.P.

Plant lipids and their role in membran function.

Prog. Biophys. Mol. Biol. 34, 109 – 173, (1978)

Radunz A.

Binding of antibodies onto the thylakoid membrane III. Proteins in the outer surface of the thylakoid membrane.

Z. Naturforsch. 33c, 731 – 734, (1978)

Radunz A. und Schmid G.H.

Comparative immunological studies on the CF₁-complex in mutants of *N. tabacum*, exhibiting different capacities for photosynthesis and photorespiration and different chloroplast structures.

Z. Naturforsch. 44c, 689 – 697,(1989)

Retallack G.J. [1997]

Early forest soils and their role in devonian global change.

Science Vol. 276, 583 – 585, 1997

Reining E.

Acclimation of C₃ photosynthesis to elevated CO₂: hypotheses and experimental evidence.

Photosynthetica 30 (4), 519 – 525, (1994)

Renart J., Reiser J. und Stark G.R.

Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure.

Pro. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3116 – 3120, (1979)

Richter G.

Stoffwechselfysiologie der Pflanzen

Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, (1988)

Richter G.

Biochemie der Pflanzen
Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, (1996)

Robertson E.J. und Leech R.M.

Significant changes in Cell and Chloroplast Development in young wheat leaves
(Triticum aestivum cv Hereward) grown in elevated CO₂.
Plant Physiol. 107, 63-71, (1995)

Rüppel H. und Witt H.T.

Measurement of fast reactions by single and repetitive excitation with pulses of
electromagnetic radiation.
Methods in Enzymology 16, 316 – 379, (1969)

Sage R.F.

Acclimation of photosynthesis to increasing atmospheric CO₂: The gas exchange
perspective.
Photosynth. Res. 39, 351 – 368, (1994)

Satoh K., Kashino Y. und Koike H.

Electron transport from Q_A to thymoquinone in a Synechococcus oxygen-evolving
photosystem II preparation: Role of Q_B and binding affinity of Thymoquinone to the
Q_B Site.
Z. Naturforsch. 48c, 174 – 178, (1993)

Satoh K., Oh-Hashi M., Kashino Y. und Koike H.

Mechanism of electron flow through the Q-B site in photosystem II. 1. Kinetics of the
reduction of electron acceptors at the Q-B and plastoquinone sites in photosystem II
particles from the cyanobacterium Synechococcus vulcanus.
Plant & Cell Physiology 36 (4), 597 – 605, (1995)

Scheller H.V., Svendsen Ib. und Moller B.L.

Subunit Composition of Photosystem I and Identification of Center X as a [4Fe -4S]
Iron- Sulfur Cluster.
J. Bio. Chemistry 264, Nr. 12, 6929 – 6934, (1989)

Schmid, G.H.

Origin and properties of mutant plants: Yellow Tobacco.
Methods in Enzymology 23, 171 – 194, (1971)

Schmid G.H., Radunz A. & Gröschel-Stewart U.

Immunologie und ihre Anwendung in der Biologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1993)

Schmid G. H., Price J.M., Gaffron H.

Lamellar structure in chlorophyll deficient but normally active chloroplasts.
J. Microscopy 5, 205 – 212, (1966)

Schmid G.H., Radunz A., He P., Kedeinis Ch.

Influence of a CO₂-Partial Pressure of 700 ppm on the Lipid and Fatty Acid Composition of Higher Plants.

J.H. Argyroudi-Akoyunoglou and H. Senger (eds.), The Chloroplast: From Molecular Biology to Biotechnology, 337 – 342, Kluwer Academic Publishers. (1999)

Schmid G.H. und Gaffron H.

Light metabolism and chloroplast structure in chlorophyll-deficient tobacco mutants.

J. Gen. Physiol. 52, 212 - 239 (1967)

Schwarzbach M.

Das Klima der Vorzeit, zweite Auflage

Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 1961

Sengbusch P. von

Botanik

McGraw-Hill Book Company GmbH, Hamburg, 1989

Setif P., Acker S., Lagoute B. und Duranton J.

Contribution to the structural characterization of eucaryotic PS I reaction centre-II.

Characterization of a highly purified photoactive SDS-CP1 complex.

Photosynth. Res. 1, 17 – 21, (1980)

Seneweera S.P. und Conroy J.P.

Growth, grain yield and quality of rice (*Oryza sativa* L.) in response to elevated CO₂ and phosphorus nutrition.

Soil Science and Plant Nutrition 43, 1131-1136, (Dec., 1997)

Sgherri C.L.M., Quartacci M.F., Menconi M., Raschi A. und Navari I.F.

Interactions between drought and elevated CO₂ on alfalfa plants.

J. of Plant Physiology 152, 118-124, 1998

Siefermann-Harms D.

Carotinoids in photosynthesis. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function.

Biochim Biophys Acta 811, 325 – 355, (1985)

Siefermann-Harms D.

The light-harvesting and protective functions of carotinoids in photosynthetic membranes.

Physiol. Plant 69, 561 – 568, (1987)

Smith P.K., Krohn, R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D.,

Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. & Klienck D.C.

Measurement of protein using bicinchoninic acid.

Analyt. Biochem. 150, 76 –85, (1985)

Specht S.

Untersuchungen zur Struktur und Regulation von Photosystem II aus *Nicotiana tabacum* var. John William's Broadleaf und seiner chlorophyllarmen Mutanten Su/su und Su/su Aurea.

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld, (1989)

Specht S., Kuhlmann M. & Pistorius E.K.

Further investigations on structural and catalytic properties of O₂ evolving preparations from tobacco and two chlorophyll deficient tobacco mutants.

Photosynthesis Research 24, 15 – 26, (1990)

Steppuhn J., Hermans J., Nechushtai R., Herrmann G.S. und Herrmann R.G.

Nucleotide sequences of cDNA clones encoding the entire precursor polypeptide for subunit VI and the plastomer encoded gene for subunit VII of the photosystem I reaction center from spinach.

Current Genetics 16, 99 – 108, (1989)

Stitt M.

Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells.

Plant, Cell and Environment 14, 741-762, (1991)

Thornber J.P.

Biochemical Characterization and Structure of Pigment-Proteins of Photosynthetic Organism.

Encyclopedia of Plant Physiology: Photosynthesis III: Photosynthetic Membranes and Light Harvesting Systems. Volume 19, 98 - 135

Springer Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo (1986)

Thornber J.P., Peter G.F., Morishige D.T., Gomez S., Anandan S., Kerfeld C., Welty B.A., Lee A., Takeuchi T.S. und Preiss S.

Light harvesting in Photosystem I and II.

Biochem. Soc. Trans. 21, 15 – 18, (1993)

Vainstein A., Peterson C.C. und Thornber J.P.

Light-harvesting pigment-proteins of Photosystem I in Maize.

J. Biol. Chemistry Vol. 264, Nr. 7, 4058 – 4063, (1989)

Van Oosten J.J., Wilkins D. und Besford R.T.

Regulation of the expression of photosynthetic nuclear genes by CO₂ is mimicked by regulation by carbohydrates: a mechanism for the acclimation of photosynthesis to high CO₂?

Plant, Cell and Environment 17, 913-923, 1994

Van Oosten J.J und Besford R.T.

Some relationships between the gas exchange, biochemistry and molecular biology of photosynthesis during leaf development of tomato plants after transfer to different carbon dioxide.

Plant, Cell and Environment 18, 1253-1266, 1995

Vivin P. und Guehl J.M.

Changes in carbon uptake and allocation patterns in *Quercus robur* seedlings in response to elevated CO₂ and water stress.

Annales des Sciences Forestieres Paris 54 (7), 597-610, 1997

Vu J.C.V., Baker J.T., Pennanen A.H., Allen L.H.-Jr., Bowes G und Boote K.J.

Elevated CO₂ and water deficit effects on photosynthesis, ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, and carbohydrate metabolism in rice.

Physiologia Plantarum 103 (3), 327-339, 1998

Williams C.A. und Chase M.W.

Methods in Immunology and Immunochemistry, Bd. II, 266 f., (1968)

Witt H.T.

Coupling of quanta, electrons, fields, ions and phosphorylation in the functional membrane of photosynthesis. Result by pulse spectroscopic methods.

Quarterly Reviews of Biophysics 4,4, 365 – 477, 1971

Wollman F.A., Minai L., Nechushtai R.

The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes.

Biochimica et Biophysica Acta 1411, 21-85, (1999)

Woodrow I.E.

Optimal acclimation of the C₃ photosynthetic system under enhanced CO₂.

Photosynth. Res. 39, 401-412, (1994)

Woodward F.I.

Stomatal numbers are sensitive to increases in CO₂ from pre-industrial levels.

Nature 327, 617-618, (1987)

Wynn R.M. und Malkin R.

Characterization of an isolated chloroplast membrane Fe-S protein and its identification as the photosystem I Fe-S_A / Fe-S_B binding Protein.

FEBS Lett. 229, Nr. 2, 293 – 297, (1988)

Yamamoto H.Y. and Bassi R.

Carotenoids: Localization and Function.

Oxygenic Photosynthesis: The Light Reaction, 539 – 563, (1996)

Yamamoto H.Y., Nakayama T.O.M. and Chichester C.O.

Studies on the light and dark interconversion of leaf xanthophylls.

Arch. Biochem. Biophys 97, 168 – 173, (1962)

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Bielefeld, im Oktober 2001

Karsten Alfermann

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier nach ISO 9706.