



# Charakterisierung der Photosynthesepigmente der Nicotina tabacum Pflanze

Wildtyp vs FC1-Antisense-Mutante

Versuchsdurchführende

...

Versuchsort

..

Versuchsbetreuer

..

11. Juni 2024

# Contents

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 Einführung</b>   | <b>2</b>  |
| <b>2 Material und Methode</b>   | <b>2</b>  |
| 2.1 Herstellung des Pigmentextraktes . . . . .                                  | 2         |
| 2.2 Photometrische Bestimmung Chlorophylle a und b . . . . .                    | 2         |
| 2.3 DC-Trennung Chlorophylle und Carotinoide . . . . .                          | 2         |
| 2.4 Fluoreszenz des Chlorophyllextractes . . . . .                              | 3         |
| 2.5 Phäophytinbildung . . . . .   | 3         |
| <b>3 Ergebnis</b>   | <b>3</b>  |
| 3.1 Konzentrationsbestimmung von Chlorophylle im Rohextrakt . . . . .           | 3         |
| 3.2 Quantitative Bestimmung der Pigmentebestandteile des Rohextraktes . . . . . | 4         |
| 3.3 Fluoreszenzmessung des Pflanzenextraktes . . . . .                          | 8         |
| 3.4 Phäophytinbildung . . . . .   | 8         |
| <b>4 Diskussion</b>   | <b>8</b>  |
| 4.1 Quantifizierung Photosynthesepigmente . . . . .                             | 8         |
| 4.2 Fluoreszenzverhalten von Chlorophylle . . . . .                             | 10        |
| 4.3 Stabilität von Chlorophylle . . . . .                                       | 11        |
| <b>5 Conclusion</b>   | <b>12</b> |
| <b>6 Anhang</b>   | <b>13</b> |
| 6.1 Rechenwege . . . . .  | 13        |
| 6.2 Rohdaten . . . . .  | 13        |
| 6.2.1 Einwaage der Proben . . . . .   | 13        |
| 6.2.2 Extinktion des Rohextraktes . . . . .                                     | 14        |
| 6.2.3 Substanzstrecke auf der DC-Platte . . . . .                               | 14        |
| <b>References</b>   | <b>14</b> |

# 1 Einführung

Photosynthese ist ein biochemischer Prozess der von grünen Pflanzen, einigen Algenarten und bestimmten Bakterien, genutzt wird um Licht zu absorbieren und energetisch nutzbar zu machen. In den höheren Pflanzen sind hierfür die Pigmente Chlorophyll a und b(abgekürzt: Chl a und Chl b), sowie einige Carotinoide zuständig, welche in Verbindung mit den Pigment-bindenden-Proteinen der Photosysteme I und II, in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten zu finden sind. Die Pigmente dienen der aufnahme von Lichtenergie und der Weiterleitung dieser zu den Reaktionszentren, wo eine Elektronentransportkette eingeleitet wird, um als Teil der lichtabhängigen Reaktion, ATP und NADPH zu synthetisieren und letztendlich, während der Dunkelreaktion Glukose zu bilden.

In diesen Versuch werden die Photosynthesepigmente Chlorophylle und Carotinoide in den Wildtyp und FC1-antisense-Mutant (abgekürzt: Mutant) von der Pflanze Nicotina tabacum untersucht. Die Ziele der Versuche sieht wie folgt aus:

- Charakterisierung der einzelnen Photosynthesepigmente in Wildtyp- und Mutantenpflanze mittels Absorptionsspektrum und Trennung der Pigmentbestandteile mittels Dünnschichtchromatographie (abgekürzt: DC)
- Fluoreszenzeigenschaft von Chlorophylle in wässrigen und organischen Lösemittel und der Einfluss des Mediums auf die Struktur
- Stabilitätsuntersuchung von Chlorophylle

## 2 Material und Methode

Die Verdünnungen und Homogenisieren wurde jeweils auf Eis durchgeführt.

### 2.1 Herstellung des Pigmentextraktes

Es wurde 0.9965g Pflanzenmaterial des Wildtyps und 0.9960g des Mutantes eingewogen (zwei Blätter der Mutantenpflanze haben weiße Flecken).

Die Proben wurden mit kalten basischen Aceton (100% Aceton und 20mM NH<sub>4</sub>OH) homogenisiert und über einem Miraclothfilter in einem 50mL Falconrörchen filtriert. Ein Spatelspitze Quarzsand wurde hier als zusätzlichen Zerkleinerungshilfe verwendet.

Flüssiger Extrakt der jeweiligen Pflanzentypen wurde in einem 15mL Falcon vereinigt.

### 2.2 Photometrische Bestimmung Chlorophylle a und b

Um eine quantitative Bestimmung von Chlorophyll a und b durchzuführen, wurden zuerst 0.2ml des Wildtyp-Extrakts (WT) und des der Mutante (MU) in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde ein Verhältnis von 1:5 geschaffen, indem 0.8ml basisches Aceton hinzugegeben wurde.

Das Gemisch wurde gevortext und für eine Minute bei 15.000 rpm herunterzentrifugiert. Die photometrische Bestimmung von 1 mL Probevolumen erfolgte bei 470nm, 646nm, 663nm und 720nm wobei 720nm Wellenlänge als Maß für Verunreinigung diente und 470nm als nicht relevanter Kontrollwert.

Als Blank-Lösung wurde das Extraktionslösung (basisches Aceton) verwendet.

### 2.3 DC-Trennung Chlorophylle und Carotinoide

5 mL des basischen Pigmentextraktes vom Wildtyp und Mutant wurde mit 1 mL Petrolether versetzt und 3 mal vorsichtig invertiert. Die Proben wurden für 10 Minuten im Eis inkubiert und die obere dunkelgrüne Phase für die weiteren Versuchen in einem 1.5mL Eppendorf Tube überführt.

50 $\mu$ L von den Wildtyp- und Mutantenextraktes wurden auf einer Dünnschichtchromatographieplatte (abgekürzt: DC-Platte) als breites Band aufgetragen. In einem mit Laufmittel (Petrolether/Aceton/Isopropanol/Wasser, 400:80:48:1)-abgesättigte DC-Kammer wird die DC-Platte inkubiert und der Lauf wurde gestoppt, als diese 5 mm Abstand zur DC-Plattenkante erreicht hatte. Die nebeneinanderliegenden Banden vom Wildtyp und Mutant wurde gemeinsam extrahiert (1. und 4. Bande mit Ethanol gelöst und 2. und 3. Bande mit basischen Aceton), bei 15000rpm abzentrifugiert und das Absorptionsspektrum des Überstandes bei  $\lambda = 350 - 720$  nm gemessen. Als Blanklösung diente hier bei den Ethanolproben Ethanol und bei den Acetonproben basisches Aceton.

## 2.4 Fluoreszenz des Chlorophyllextractes

Es wurde 0.5mL von den Wildtyp- und Mutantpetroletherextract von Abschnitt 2.3 und 0.5mL von den Wildtypextraktes in wässrigen Lösung in einem Eppi überführt und am UV-Tisch das Fluoreszenzverhalten beobachtet.

## 2.5 Phäophytinbildung

200  $\mu$ L des Petrolextraktes wurde 1:2 mit Aceton verdünnt und dann tropfenweise mit 1M Salzsäure solange zugegeben bis die Farbe von grün zu braun umschlägt.

# 3 Ergebnis

## 3.1 Konzentrationsbestimmung von Chlorophylle im Rohextrakt

Die Konzentration von Chlorophyll a und b wurde mit der Gl. 1 und 2 photometrisch bestimmt. Es wurde eine Konzentration für Chl a von 2.221 $\mu$ g/g Frischgewicht und Chl b von 0.510  $\mu$ g/g Frischgewicht für das Wildtyp gemessen. Für die Mutante betrug die Konzentration an Chl a 3.363 $\mu$ g/g Frischgewicht und Chl b 0.742 $\mu$ g/g Frischgewicht gemessen.  
Rechenweg kann im Anhang (Figure 11) nachvollzogen werden.

$$\frac{(12.21 \cdot (A_{663} - A_{720}) - 2.81 \cdot (A_{646} - A_{720}))}{V(Extrakt)} \cdot Verdünnungsfaktor \\ m(Frischgewicht) \quad (1)$$

$$\frac{(20.21 \cdot (A_{663} - A_{720}) - 4.91 \cdot (A_{646} - A_{720}))}{V(Extrakt)} \cdot Verdünnungsfaktor \\ m(Frischgewicht) \quad (2)$$

Table 1: Chlorophyll a und b Konzentration des Rohextraktes vom Wildtyp und Mutant der Nicotina tabacum Pflanze.

| Typ     | c[Chl a] in $\mu$ g/g Frischgewicht | c[Chl b] in $\mu$ g/g Frischgewicht |
|---------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Wildtyp | 2.221                               | 0.510                               |
| Mutant  | 3.363                               | 0.742                               |

### 3.2 Quantitative Bestimmung der Pigmentebestandteile des Rohextraktes

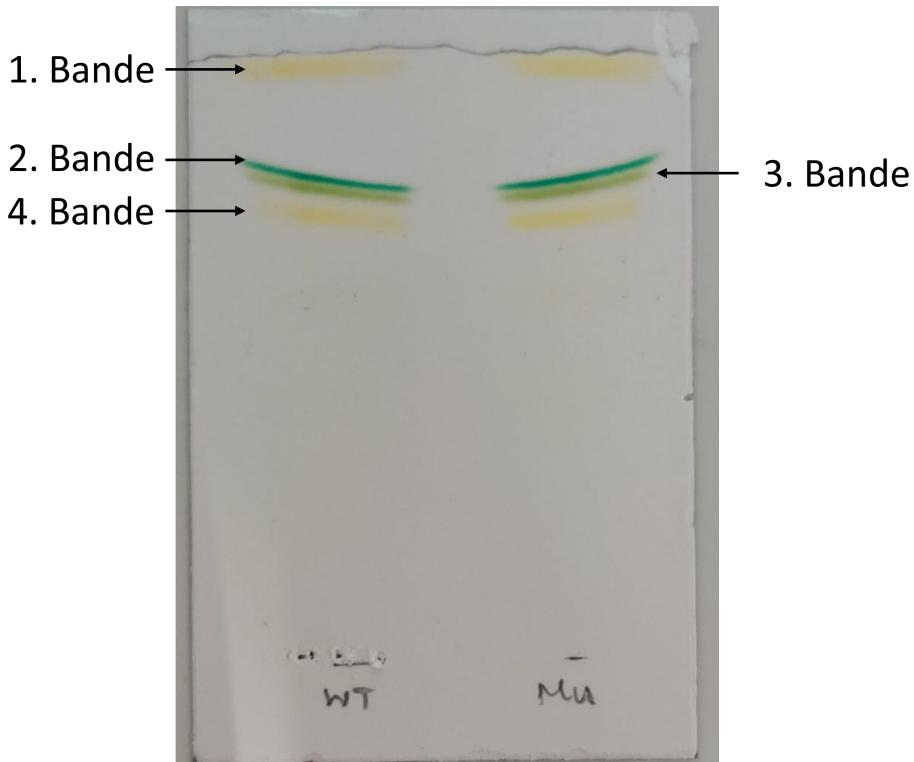


Figure 1: Probenauftrennung mittels Dünnschicht Chromatographie-Platte von der Spezies *Nicotina tabacum* (Wildtyp und FC1 - Mutant). Pigment wurden in Petrolether überführt und auf die Platte aufgetragen.

Auf der DC-Platte sind 4 stark gefärbte Banden (siehe Figure 1) beim Wildtyp und Mutant zu sehen. Für die Quantifizierung der Banden wurde der  $R_f$ -Wert nach Gl. 3 bestimmt und die Werte in Tab 2 zu sehen sind

$$R_f = \frac{\text{Substanzstrecke}}{\text{Laufmittelfront}} \quad (3)$$

Band 1 und 4 sind gelblich gefärbt und Band 2 und 3 grünlich, wobei die dritte Bande hellgrün gefärbt ist.

Table 2:  $R_f$ -Werte von Band 1-4 aus Figure 1 vom Nicotina Tabacum Wildtyp und Mutant.

| Band | Wildtyp | Mutant |
|------|---------|--------|
| 1    | 0.97    | 0.97   |
| 2    | 0.79    | 0.79   |
| 3    | 0.73    | 0.73   |
| 4    | 0.61    | 0.61   |

Das Absorptionsverhalten der Bande 1 zeigt ein stark verrauschte Kurve, wo der Absorptionsmaximumbereich ungefähr bei  $\lambda = 420 - 460$  nm (siehe Figure 2) liegt.

Band 2 besitzt zwei Absorptionsmaxima bei  $\lambda = 430$  und  $664$  nm (siehe Figure 3) und zusätzlich

zwei kleinen Peak bei  $\lambda = 412$  nm und  $614$  nm.

In Figure 4 besitzt die Substanz der Bande 3 ebenfalls mehr als zwei Absorptionsmaxima. Zwei Absorptionsmaxima sind bei  $\lambda = 458$  und  $646$  nm und ein weiteren kleinen Peak bei  $\lambda = 434$  nm. Die Absorptionskurve von Bande 4 ist wie von Bande 1 etwas verrauscht und hat zwei Peaks bei  $\lambda = 448$  und  $476$  nm (siehe Figure 5).

Bei den vier Absorptionsspektrum (Figure 2 - 5) existiert ein kleiner Peak bei  $\lambda = 540$  nm.

Die vom Betreuer gegebene Pigmentextraktes zeigt mehrere Peaks (siehe Figure 6), welches bei der Überlappung mit Bande zwei und drei Gemeinsamkeiten der Absorptionsmaxima zeigen (Siehe Figure 7). Ein Peak jedoch ist beim Pigmentextrakt nicht zu sehen, welches bei Bande 3 zu sehen ist. Der Peak bei  $\lambda = 646$  nm wurde in Figure 7 rot hervorgehoben.

Die Signalintensität des Pigmentextraktes ist circa 3 mal höher als die von Band 2 und 3.

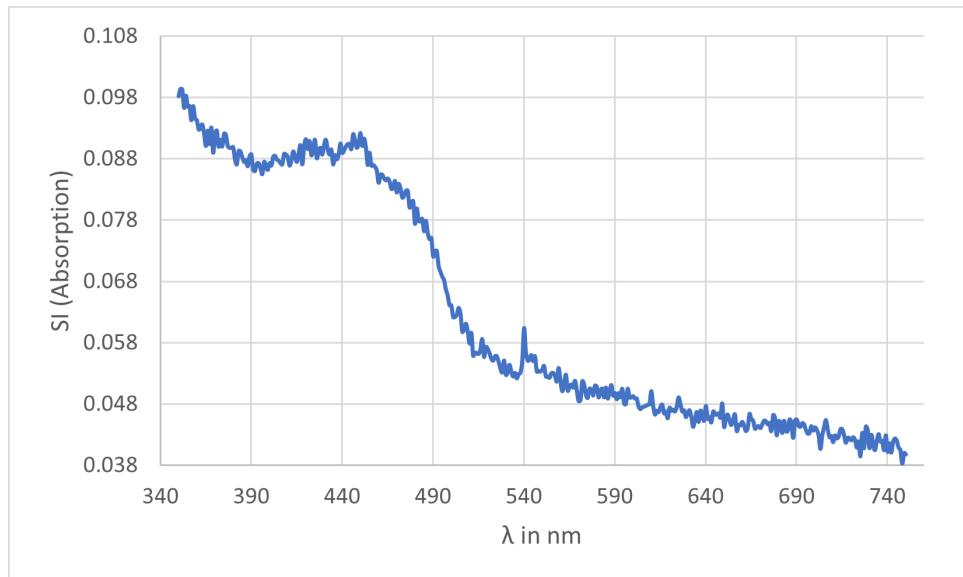


Figure 2: Absorptionsspektrum der ersten Bande aus Figure 1. Absorptionsmaxima liegt bei  $\lambda = 420$  bis  $460$  nm.

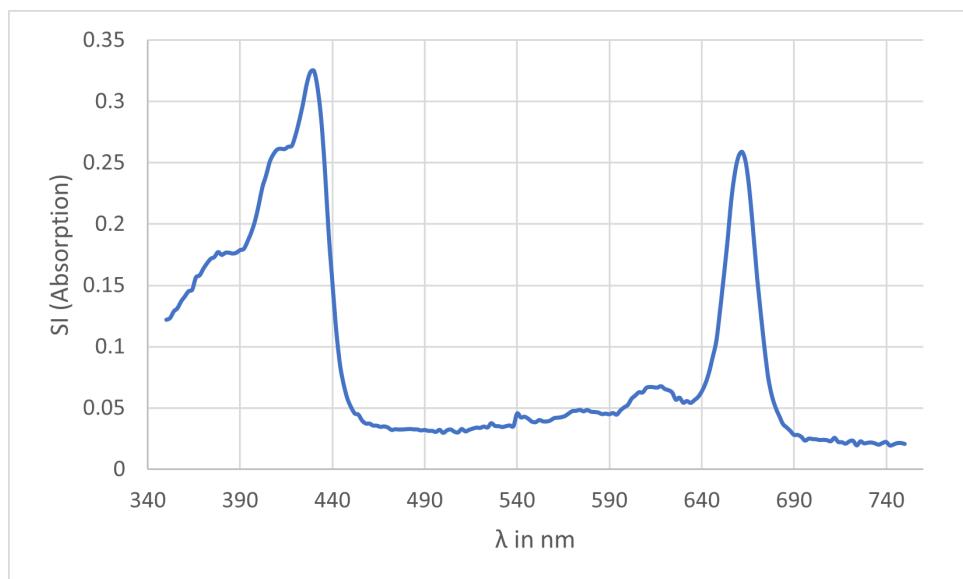


Figure 3: Absorptionsspektrum der zweiten Bande aus Figure 1. Absorptionsmaxima Bereich liegt im Bereich  $\lambda = 430$  und  $664$  nm.

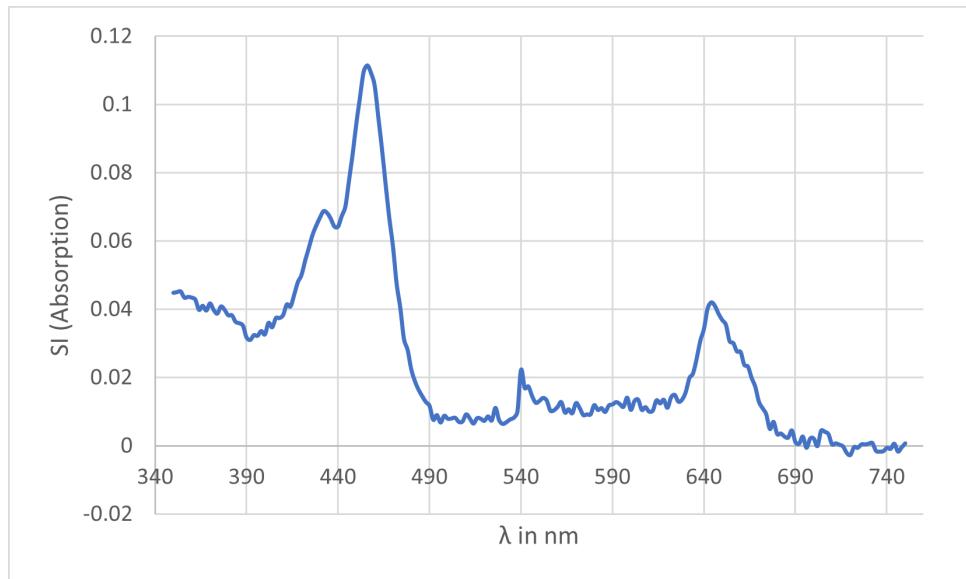


Figure 4: Absoprtionsspektrum der dritten Bande aus Figure 1. Absorptionsmaxima Bereich liegt im Bereich  $\lambda = 458$  und  $646$  nm. In diesen Absorption gibt es ein weiteren Peak bei  $\lambda = 434$  nm

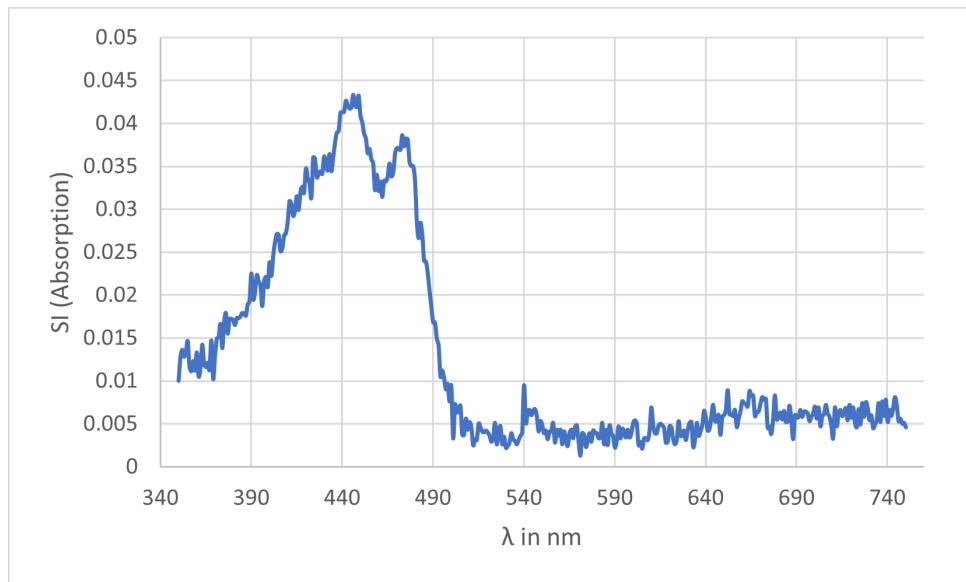


Figure 5: Absoprtionsspektrum der vierten Bande aus Figure 1. Absorptionsmaxima Bereich liegt im Bereich  $\lambda = 448$  und  $476$  nm.

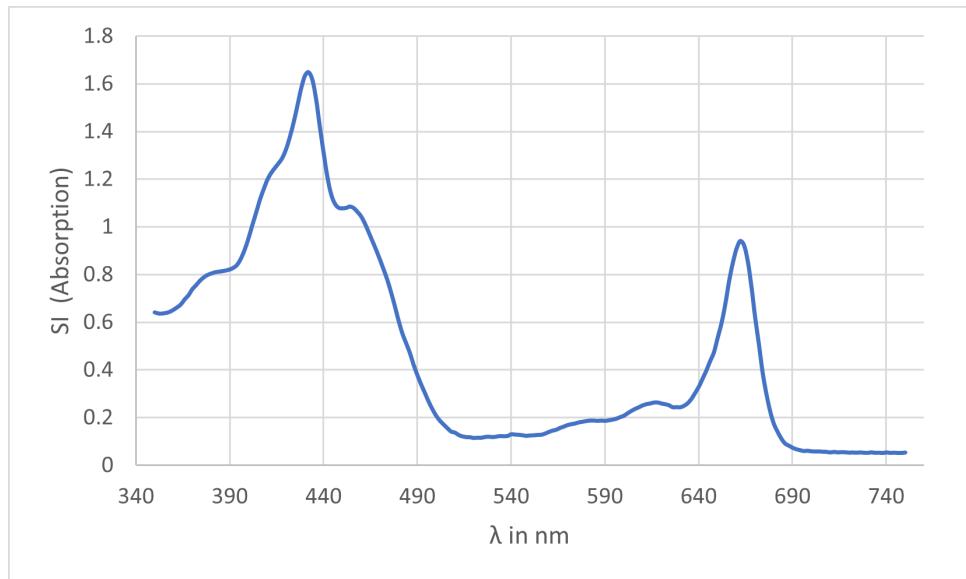


Figure 6: Absorptionsspektrum vom Pigmentextraktes, welches der Betreuer uns mitgegeben hat.

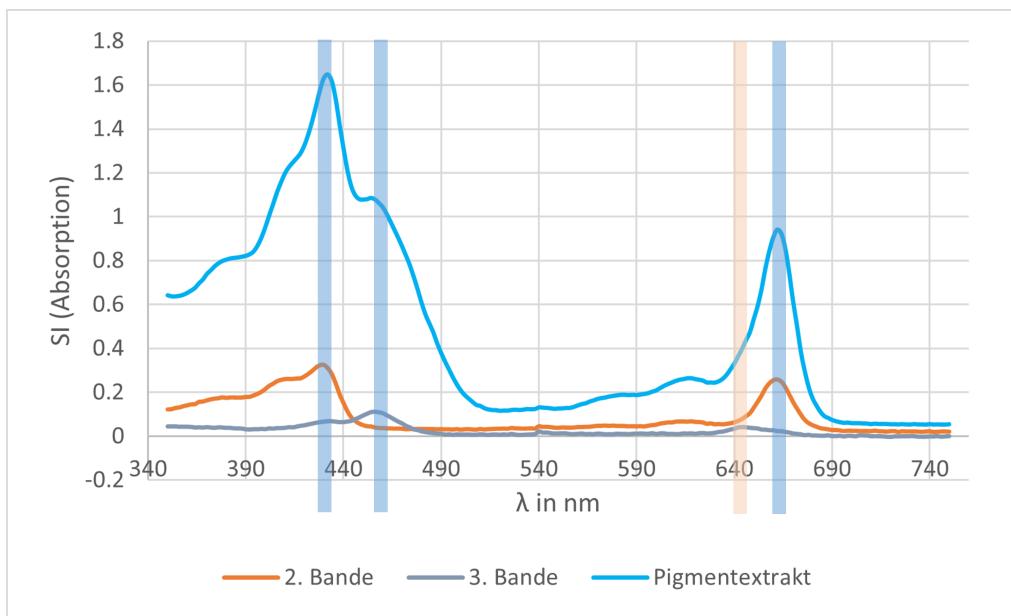


Figure 7: Vereintes Absorptionsspektrum von der unbekannten Probenextraktes, der zweiten und dritten Bande. Die Maximas der zweiten und dritten Bande wurde hier farblich hervorgehoben. Die rote Markierung zeigt ein fehlenden Peak bei der unbekannte Probeextraktes

### 3.3 Fluoreszenzmessung des Pflanzenextraktes

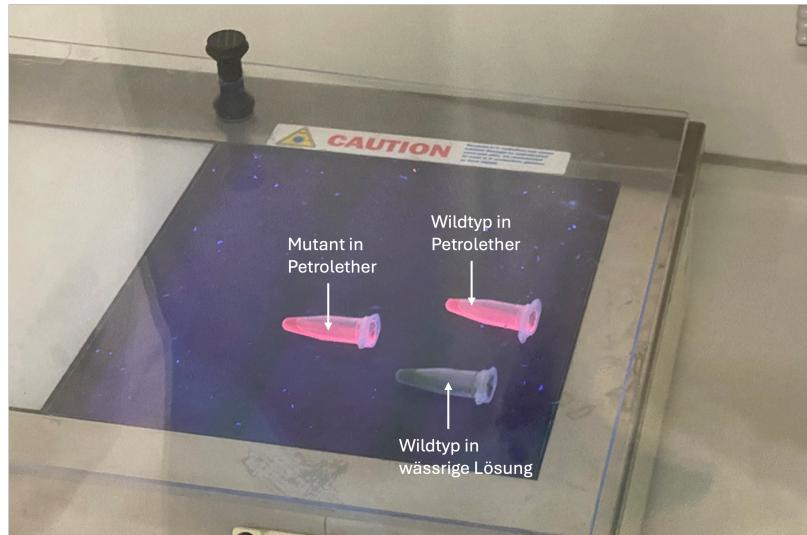


Figure 8: Fluoreszenzverhalten des Chlorophylls in Gegenwart von UV-Licht vom Wildtyp und Mutant in Petrolether und Wildtyp in wässrigen Lösung

In Figure 8 ist zu erkennen, dass die mit Petrolether versetzen Extrakte rot leuchten und das wässrige Extrakt nicht leuchtet, bzw. keine Verfärbung aufweist.

### 3.4 Phäophytinbildung

Durch Zugabe von schon einem Tropfen Salzsäure zum Petroletherextrakt des Wildtyps konnte eine bräunliche Verfärbung an der Oberfläche des Extraks erkannt werden. Durch Schütteln des Extraks verfärbte sich das gesamte Extrakt in ein schmutziges Dunkelgrün. Auch beim Petroletherextrakt der Mutante konnte eine Verfärbung beobachtet werden, die der des Wildtyps glich.

## 4 Diskussion

Aus der Nicotina Tabacum Pflanze wurde von der FC1-Antisense Mutante mehr Chlorophylle a und b als beim Wildtyp extrahiert (siehe Table 1).

Das Verhältnis zwischen Chl a und Chl b bei beiden Pflanzentypen sind gleich. Chl a ist 1.5 mal mehr konzentriert als Chl b.

### 4.1 Quantifizierung Photosynthesepigmente

In Figure 1 ist zu erkennen, dass beim Wildtyp und Mutant die vier Banden jeweils die gleichen  $R_f$ -Werte besitzen. Eine Farbintensitätsunterschied zwischen den beiden wird nicht beobachtet, was auch daran liegen kann, dass die eingesetzte Konzentration bei beiden unterschiedlich waren. (Vom Mutant liegt die Chlorophyllkonzentration 1.5 mal höher).

Bei der Extraktion der Pigmente in den Banden wurde angenommen, dass es sich bei Mutant und Wildtyp um die gleiche Substanz handelt und diese somit vereint werden konnte um das Absorptionsspektrum mit einer guten Signalintensität beobachtet werden kann.

Farblich gesehen handelt es sich bei der 2. und 3. Bande um Chlorophylle und bei der 1. und 4. Bande um eine Carotinoid-Verbindung.

Chlorophylle absorbiert im roten und blauen Bereich und erscheint somit grün für das menschliche

Auge. Carotinoide absorbiert im blauen Bereich und erscheint orange bis gelblich. Die Funktion des Chlorophylls ist in den Pflanzenzellen Licht zu absorbieren, Energie zu transferieren und Ladungen zu trennen und Carotinoide-Verbindungen schützen die Zellen vor oxidativen Schäden, indem sie bei zu viel Energiezufuhr diese in Wärme umwandeln (Wärmedissipation).

Die DC-Trennung, welches hier verwendet wurde, um die Pigmente zu trennen, funktioniert nach der unterschiedlichen Affinität der Substanzen zu einer stationären Phase. In diesen Versuch ist die stationäre Phase ein polares silikatbeschichtete DC-Platte.

Je polarer ein Substanz ist, desto früher bleibt diese an der stationären Phase hängen (es wird adsorbiert). Das Laufmittel bzw. mobile Phase ist in diesen Versuch ein stark unpolares organisches Lösungsmittel (Petrolethergemisch, siehe Abschnitt 2.3), dass durch Kapillarkräfte die DC-Platte durchzieht und dabei das Substanzgemisch mitzieht.

Chl a besitzt an ihren Tetrapyrrolring eine Methylgruppe und Chl b an der selben Position eine Aldehydgruppe. Somit ist Chl b polarer und hat eine größere Affinität zur stationären Phase als Chl a und läuft somit langsamer.

Anhand des Absorptionsspektrum ist zu erkennen, dass Bande 2 zwei Peaks bei  $\lambda = 430$  und  $664$  nm besitzt und diese mit Peter von Sengbusch gemessenen Absorptionsspektrum für Chl a übereinstimmt (Literaturwert ist  $\lambda = 430$  und  $662$  nm<sup>7</sup> ).

Chl b hat sein Absorptionsmaxima bei  $\lambda = 453$  und  $642$  nm<sup>7</sup> und gemessen wurde hier bei  $\lambda = 458$  und  $646$  nm.

In der Kurve in Figure 4 ist ein kleiner Peak bei  $\lambda = 434$  nm zu erkennen, dass höchstwahrscheinlich von der zweiten Bande kam. Da beide Banden relativ nah gelaufen sind, ist die Kontaminationsgefahr relativ hoch.

Dadurch dass die Absorptionsmaxima von Chl a und b verschieden sind, kann diese auch bei Kontamination differenziert werden.

Diesen Vorteil nutzen die Pflanzen auch, um das rote Licht energetisch maximal zu verwerten.

Bei den restlichen zwei Banden handelt es sich um carotinoidische Verbindungen. Die erste Bande musst eine Substanz sein, das sehr unpolär ist.  $\beta$ -Carotin ist von den Carotinoide das unpolärste Molekül.

Das Absorptionsspektrumsverhalten von  $\beta$ -Carotin ähnelt den von A.Hager gemessenen Werten  $\lambda = 451$  und  $478$  nm.<sup>4</sup> Da die Kurve in Figure 2 sehr verrauscht ist, können die beiden Absorptionsmaxima nicht genau abgelesen werden. Die Peaks liegen ungefähr in den Bereich  $\lambda = 420$  bis  $460$  nm. Aber aufgrund des Laufverhalten in der DC wird vermutet, dass es sich bei der 1. Bande um  $\beta$ -Carotin handelt.

Die 4. Bande ist polarer also die restlichen Photosynthesepigmenten. Nach A.Hager könnte es sich hier um das Carotinoid Lutein handeln, dass sein Absorptionsmaxima bei  $\lambda = 446$  und  $474$ <sup>4</sup> nm.

Zusätzlich wurde vom Betreuer ein Rohextraktprobe mitgegeben, dessen Absorptionsspektrum ebenfalls aufgenommen wurde.

Das Absorptionsspektrum wurde mit den Absorptionsspektrum des Chlorophylls verglichen (siehe Figure 7).

Die Rohextraktprobe zeigt ein kombiniertes Absorptionsverhalten von Chl a und b, mit eine kleine Ausnahme bei  $\lambda = 642$  nm. Dort fehlt dem Rohextraktes den Peakt im rotwelligen Bereich

Der Versuch zeigt, dass die Photosynthesepigmente mittels DC aufgetrennt werden kann. Die Zuordnung der einzelnen Pigmenten zu den Substanzen kann nicht alleine durch das Absorptionsspektrum charakterisiert werden und könnte bei der DC-Trennung mit einem Referenzsubstanzen besser quantifiziert werden. Die Carotinoide zeigen untereinander ein relativ ähnliches Absorptionsverhalten, jedoch mit parallel laufenden Referenzsubstanzen kann die Polarität noch ein Charakterisierungsmerkmal sein.  $\beta$ -Carotin konnte als einzige aufgrund der unpolaren Struktur gut identifiziert werden.

Für eine bessere Bandenauf trennung, insbesondere von Chl a und b, könnte der Lauf zusätzlich verlängert werden.

## 4.2 Fluoreszenzverhalten von Chlorophylle

Zu das Fluoreszenzverhalten von Chlorophylle in Figure 8. Das rote Leuchten der Petroletherextrakte kann man als Fluoreszenz deuten. Um zu verstehen, warum man eine Fluoreszenz bei dem Petroletherextrakt beobachten kann ist, muss man verstehen, warum Blätter nicht fluoreszieren, wenn man sie mit einer UV-Lampe bestrahlt, obwohl sie natürlich Chlorophyll enthalten. Nun, solange sich Chlorophyll im Blatt befindet, erfüllt es seine Funktion als Pigment im Photosystem I und II, kann also durch die energetische Anregung als Energiedonor dienen. Wird es, wie in diesem Experiment durchgeführt, aus den Pflanzenzellen extrahiert, dann kann man eine Fluoreszenz unter dem UV-Licht beobachten. Das Petroletherextrakt sorgt dafür, dass die Photosysteme zerstört werden und die von den Chlorophyllen aufgenommenen Photonen nicht auf das restliche Photosystem übertragen werden, sondern direkt wieder reflektiert werden.

Zwischen dem Wildtyp und der Mutante sind keine auffälligen Unterschiede in der UV-Licht-induzierten Färbung zu erkennen. Jedoch könnte man bei der Mutante, aufgrund des Vorhandenseins des 35S-Promotors, vermuten, dass die Färbung weniger stark intensiv rot ist. Da p35S ein antisense Promotor für FC1 ist, würde dies eine Runterregelung von Chlorophyll bedingen. Warum ist dies nun mit einer verringerten Färbung zu assoziieren, also was bedeutet Chlorophyllfluoreszenz?

Chlorophyll a und b haben je zwei Absorptionsmaxima, je eines im Bereich der blauen und roten Wellenlängen des sichtbaren Lichtes. Chlorophyll a absorbiert im blauen Bereich (430-450 nm), mit einem Peak bei 430 nm und im roten Bereich (640-680 nm), mit einem Peak bei 662 nm. Chlorophyll b absorbiert auch im auch im blauen und roten Bereich, jedoch bei Wellenlängen von 450-500 nm und 640-660 nm, mit Peaks bei 453 nm und 642 nm.

Es verbleibt ein Bereich des Spektrums zwischen 490 und 620 nm im grüner Wellenlängenbereich, der nicht absorbiert wird und stattdessen reflektiert wird, auch „die Grünücke“ genannt, welche die charakterisierende grüne Farbe von Pflanzen hervorruft. Die oben behandelte Absorption von sichtbarem Licht wird zudem begleitet von einer Emission, bzw. Fluoreszenz von Schwachlicht im längerwelligen Bereich, hauptsächlich erzeugt durch angeregte Chlorophyll-a-Moleküle im Reaktionszentrum P680 des Photosystem II. Das Niveau der Anregung von Chlorophyll ist abhängig von der Wellenlänge des Lichts: blaues Licht zum Beispiel führt zum zweiten Singulettzustand, rotes Licht hingegen verursacht den ersten Singulettzustand. Der zweite Singulettzustand kann unter Wärmeabgabe in den ersten Singulettzustand übergehen. Die Energie des ersten Singulettzustands kann für den Excitonentransfer zwischen den Chlorophyllmolekülen und im Reaktionszentrum P680 für die Elektronenübertragung auf den Primärakzeptor Q, dem „Quencher“, genutzt werden. Die Energie kann jedoch auch durch Fluoreszenz oder Wärme in den Grundzustand zurückfallen oder in den Tripletztzustand übergehen, woraufhin durch Wärmeabgabe oder Phosphoreszenz das Chlorophyll in den Grundzustand zurückkehren oder seine Energie auf Carotinoide übertragen kann.

Nun, wie ist der starke Unterschied zwischen den Petroletherextrakten und dem wässrigen Extrakt zu erklären? Nun, hinleitend ist es sinnvoll zu verdeutlichen wie Phäophytine entstehen können und was die Auswirkungen dessen sind. In diesem Experiment werden zuerst durch das Mörsern die pflanzlichen Zellen grob zerstört. Als Nächstes spielt das basische Aceton eine wichtige Rolle, denn es puffert die sauren Inhalte der Vakuolen. Würde der pH-Wert nicht gepuffert werden und einen Wert von 5,5 oder geringer erreichen, würden die apolaren Chlorophylle, durch Tauschen des Magnesium-Ions im aktiven Zentrum für ein Protonen, zu einem Phäophytin werden. Der genaue biochemische Vorgang ist wie folgt: das aktive Zentrum von Chlorophyll besteht aus einem zentralen Magnesiumion, koordiniert durch vier Stickstoffatome in einem tetrapyrrolischen Ringsystem. Der Verlust vom Magnesiumion, bei geringerem pH-Wert, ist bedingt durch höhere Protonenkonzentration, was dazu führt, dass die Stickstoffatome im aktiven Zentrum von Chlorophyll a protoniert werden. Dadurch ist die Koordination zwischen den Stickstoffatomen und dem Magnesiumion reduziert, weshalb das Magnesiumion leichter von einem affineren Proton verdrängt werden kann. Letztendlich führt dies dazu, dass sich die Struktur, bzw. der Elektronen-

resonanz des Chlorophyll-Moleküls und damit das Absorptionsspektrum verändert und dadurch die Funktion und photosynthetische Effizienz vermindert.

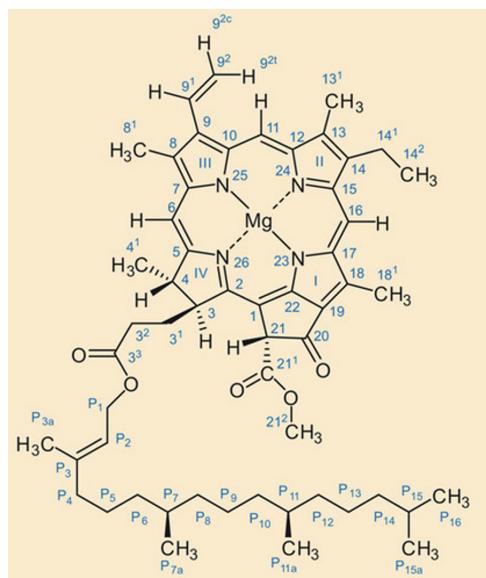
Um zurück zum Experiment zu kehren: im apolaren Medium des Petrolethers sind die Chlorophylle gut gelöst und können ihre Struktur erhalten und zeigen somit auch die charakteristische und zu erwartende Fluoreszenz. Im polaren wässrigen Medium passiert etwas Ähnliche, wie im sauren Medium (oben beschrieben): die Chlorophylle würden zu Phäophytinen und somit ihre Fluoreszenzfärbung beeinflussen. Dies spiegelt sich in den Ergebnissen wieder.

### 4.3 Stabilität von Chlorophylle

Chl a und b enthalten beide ein Zentrales Magnesium-Ion im zyklisches Tetrapyrrolring (siehe Figure 9). Dieses Magnesium-Kation ist ein wichtiger Bestandteil des Chl, und trägt zu dessen spezifischen Absorptionsspektrum bei.

Durch eine Ansäuerung des Mediums, wie es im Versuch mittels Salzsäure geschehen ist, lösen sich die Magnesium-Kationen sowohl aus Chl a als auch aus Chl b. Sie werden durch den Überschuss an Wasserstoffatomen aus dem Zentrum des Chl verdrängt. Statt des Magnesium-Kations binden die Stickstoff-Atome nun zwei Wasserstoffatome im Zentrum des Chl (siehe Figure 10). Das entstandene Molekül nennt sich Phäophytin und hat nicht nur eine andere Strukturformel als Chl, sondern auch andere Eigenschaften. So hat Phäophytin eine, im Vergleich zu Chl, leicht veränderte Elektronenresonanz und damit einhergehend auch ein leicht verändertes Absorptionsspektrum. Diese Veränderung des Absorptionsspektrums wurde im Versuch sichtbar gemacht. Es kommt zu einer Veränderung der Farbe bei Chl a von blaugrün nach olivgrün und bei Chl b von gelbgrün nach bordeauxrot.<sup>5</sup> Da das Petroletherextrakt sowohl Chl a als auch Chl b enthielt, mischten sich gelbgrün und bordeauxrot zu einem oliv- bis bräunlichen Ton, wie er im Versuch beobachtet wurde.

Da die Vakuolen der Pflanzenzellen häufig einen sauren pH-Wert haben, ist es wichtig bei der Vorbereitung einer Probe, bei der die Photosynthesepigmente gemessen werden sollen, darauf zu achten, dass es nicht zu einer Ansäuerung des Mediums kommt. Die bei der Zerkleinerung des Rohmaterials aus den Vakuolen austretenden Säure muss deshalb mit einem basischen Puffer ausgeglichen werden, sonst würden die Chl-Moleküle schon während der Extraktion zu Phäophytin umgewandelt werden. In diesem Versuch wurde als Puffer basisches Aceton genutzt.



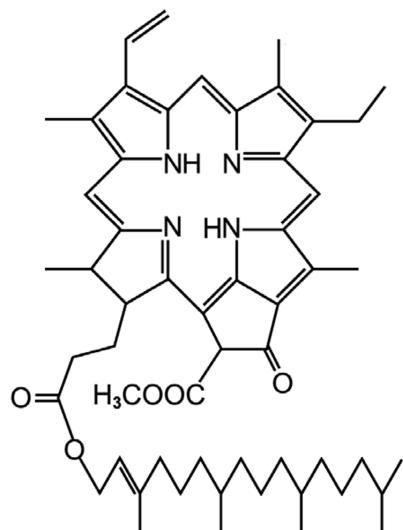


Figure 10: Strukturformel von Phäophytin a mit zwei Wasserstoff-Atomen im Zentrum<sup>1</sup>

Auch wenn die Umwandlung von Chl zu Phäophytin in Pflanzenzellen nicht erwünscht ist, und einen Funktionsverlust des Fotosynthesepigments bedeutet, so hat Phäophytin dennoch eine wichtige Rolle in der Elektronentransportkette des Photosystem II. So ist Phäophytin aufgrund seiner Eigenschaften ideal für die Weiterleitung von Elektronen. Aufgrund der nur leicht von Chl abweichenden Elektronenresonanz, fungiert Phäophytin als erster Elektronenakzeptor in der Kette.

Nachdem es zur Anregung des speziellen Chlorophyll-Paars, im Reaktionszentrum P680, durch Photonen kam, wird ein Elektron herausgelöst und an das örtlich sehr nah gelegene Phäophytin abgegeben. Dieser Prozess geschieht in wenigen Pikosekunden. Vom Phäophytin aus wird das Elektron weiter an einen Plastochinon-Komplex, bestehend aus zwei Plastochinonen, gegeben. Von hier aus wandert das Elektron weiter in der Elektronentransportkette, bis es schließlich zum Photosystem I weitergegeben wird. Im Photosystem I ist Phäophytin nicht enthalten.<sup>6</sup> Phäophytin spielt also eine wichtige Rolle im Photosystem II und macht die Photosynthese möglich.

## 5 Conclusion

Interessanterweise konnte kein Unterschied an Chlorophyllekonzentration oder Verhalten zwischen der Wildtyp-pflanze und FC1-antisense-Mutante beobachtet werden.

Diese wurde in den Paper von Daniel Hey<sup>2</sup> ebenfalls beobachtet.

## 6 Anhang

### 6.1 Rechenwege

| <u><math>\mu\text{g Cl.a/g FG}</math></u> |   |
|---|---|
| WT  | $(12,21 \cdot (0,463 - 0,012) - 2,81 \cdot (0,178 - 0,012)) \cdot 5$<br>$\frac{11,5 \text{ mL}}{0,9865 \text{ g}}$<br>$= 2,221 \mu\text{g Cl.a/g Frischgewicht}$  |
| MU  | $(12,21 \cdot (0,493 - 0,014) - 2,81 \cdot (0,188 - 0,014)) \cdot 5$<br>$\frac{8 \text{ mL}}{0,9960 \text{ g}}$<br>$= 3,3632 \mu\text{g Cl.a/g Frischgewicht}$    |
| <u><math>\mu\text{g Cl.b/g FG}</math></u> |   |
| WT  | $(20,31 \cdot (0,178 - 0,012) - 4,91 \cdot (0,463 - 0,012)) \cdot 5$<br>$\frac{11,5 \text{ mL}}{0,9865 \text{ g}}$<br>$= 0,5099 \mu\text{g Cl.b/g Frischgewicht}$ |
| MU  | $(20,31 \cdot (0,188 - 0,014) - 4,91 \cdot (0,493 - 0,014)) \cdot 5$<br>$\frac{8 \text{ mL}}{0,9960 \text{ g}}$<br>$= 0,3417 \mu\text{g Cl.b/g Frischgewicht}$    |

Figure 11: Rechenweg der Konzentrationsbestimmung von Chlorophylle a und b des Rohextraktes. Absorptionswerte bei den jeweiligen Wellenlänge  $\lambda = 470, 646, 663$  und  $720 \text{ nm}$  wurde aus der Table 4 entnommen.

### 6.2 Rohdaten

#### 6.2.1 Einwaage der Proben

Table 3: Masse der Blätter und das Volumen des in basischen Aceton extrahierten Pigmenten vom Nicotiana tabacum des Wildtyps und FC1-Antisense Mutant

|                       | Wildtyp | Mutant |
|-----------------------|---------|--------|
| m(Frischgewicht) in g | 0.9965  | 0.9960 |
| V(Rohextrakt) in mL   | 11.5    | 8      |

### 6.2.2 Extinktion des Rohextraktes

Table 4: Die Extinktion des Rohextraktes vom Wildtyp und Mutant in basischen Aceton wurde bei  $\lambda = 470, 646, 663, 720$  nm gemessen. Als Blank wurde die Extraktionslösung (100% Aceton und 20 mM NH<sub>4</sub>OH) verwendet. Die Proben wurden jeweils 1:5 mit der Extraktionslösung verdünnt.

| $\lambda$ in nm | 470   | 646   | 663   | 720   |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|
| Wildtyp         | 0.424 | 0.178 | 0.463 | 0.012 |
| Mutant          | 0.423 | 0.188 | 0.493 | 0.014 |

### 6.2.3 Substanzstrecke auf der DC-Platte

Table 5: Substanzstrecke der 4 Banden aus Figure 1 für den Wildtyp (WT) und der FC1-Mutante (MU). Die Laufmittelfront-Distanz beträgt 6.2 cm

| Substanzstrecke Wildtyp in cm | Substanzstrecke Mutant in cm |
|-------------------------------|------------------------------|
| 6.0                           | 6.0                          |
| 4.9                           | 4.9                          |
| 4.5                           | 4.5                          |
| 3.8                           | 3.8                          |

## References

- <sup>1</sup> The structure of pheophytin a. *ResearchGate*, 2024. Fig. 4. The structure of pheophytin a. URL: [https://www.researchgate.net/figure/The-structure-of-pheophytin-a\\_fig4\\_335592019](https://www.researchgate.net/figure/The-structure-of-pheophytin-a_fig4_335592019),.
- <sup>2</sup> Bernhard Grimm (Principal Investigator) Daniel Hey (first Author). Transgenic tobacco lines expressing sense or antisense ferrochelatase 1 rna show modified ferrochelatase activity in roots and provide experimental evidence for dual localization of ferrochelatase 1. published in October 2016. doi:10.1093/pcp/pcw171.
- <sup>3</sup> Bernhard Grimm. Qualitative und quantitative charakterisierung der photosynthese pigmente, 2024. Komplex 3.
- <sup>4</sup> A. Hager. Formation of maxima in the absorption spectrum of carotenoids in the region around 370 nm; consequences for the interpretation of certain action spectra, 1970. page 41, 42. URL: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF00390164.pdf>.
- <sup>5</sup> Maria; Minceva Mirjana; Sicker Dieter; Siehl Hans-Ullrich; Zeller Klaus-Peter; Berger Stefan Klaproth, Anne; Najdanova. Chlorophyll. in: Chemie in unserer zeit 50 (4). 2016. S. 260–274. doi:0.1002/ciuz.201600751.
- <sup>6</sup> Eduardo; Møller Ian M.; Murphy Angus Taiz, Lincoln; Zeiger. Fundamentals of plant physiology., 2018. New York, Sinauer Associates, New York, Oxford: Oxford University Press.
- <sup>7</sup> Peter von Sengbusch. Absorption spectra of chlorophyll a (light green) and chlorophyll b (turquoise). 1996 - 2004. URL: <https://www-archiv.fdm.uni-hamburg.de/b-online/e24/3.htm>.