

Protokoll zum Fachkurs

**Energiekonservierung  
an Chloroplasten–Thylakoiden**

Till Biskup

Matrikel-Nr. 155567

WS 2000/2001  
HU Berlin

# Inhaltsverzeichnis

<b>Einführung</b>	<b>1</b>
<b>1 Messung der O<sub>2</sub>-Produktion (Hill-Reaktion) in der Sauerstoffelektrode</b>	<b>2</b>
1.1 Versuchsziel . . . . .	2
1.2 Durchführung . . . . .	2
1.3 Berechnungen . . . . .	2
1.4 Ergebnisse . . . . .	3
1.5 Diskussion . . . . .	3
<b>2 Nachweis der ΔpH-Bildung mit der H<sup>+</sup>-Elektrode</b>	<b>5</b>
2.1 Versuchsziel . . . . .	5
2.2 Durchführung . . . . .	5
2.3 Berechnungen . . . . .	5
2.4 Ergebnisse . . . . .	6
2.5 Diskussion . . . . .	6
<b>3 Nachweis der ΔpH-Bildung mit 9-Aminoacridin</b>	<b>8</b>
3.1 Versuchsziel . . . . .	8
3.2 Durchführung . . . . .	8
3.3 Berechnungen . . . . .	8
3.4 Ergebnisse . . . . .	9
3.5 Diskussion . . . . .	9
<b>4 Photophosphorylierung, ATP/2e<sup>-</sup>-Stöchiometrie</b>	<b>11</b>
4.1 Versuchsziel . . . . .	11
4.2 Durchführung . . . . .	11
4.3 Berechnungen . . . . .	12
4.4 Ergebnisse . . . . .	13
4.5 Diskussion . . . . .	13
<b>5 Säure-Base-Phosphorylierung</b>	<b>16</b>
5.1 Versuchsziel . . . . .	16
5.2 Durchführung . . . . .	16
5.3 Berechnungen . . . . .	16
5.4 Ergebnisse . . . . .	18
5.5 Diskussion . . . . .	19
<b>6 Quantitative Bestimmung von Photosystem I (P700)</b>	<b>20</b>
6.1 Versuchsziel . . . . .	20
6.2 Durchführung . . . . .	20
6.3 Berechnungen . . . . .	20
6.4 Ergebnis . . . . .	21
6.5 Diskussion . . . . .	21
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>22</b>
<b>Anhang: Meßprotokolle</b>	<b>23</b>

## Einführung

Alle vorliegenden Versuche beschäftigen sich mit der Energiekonservierung an der Thylakoidmembran der Chloroplasten, also mit den Vorgängen bei der Lichtreaktion der Photosynthese. Einige Versuche wie die HILL-Reaktion (Versuch 1) oder das JAGENDORF-Experiment (Versuch 5) haben dabei wesentlich zu unserem heutigen Verständnis dieser Abläufe beigetragen.

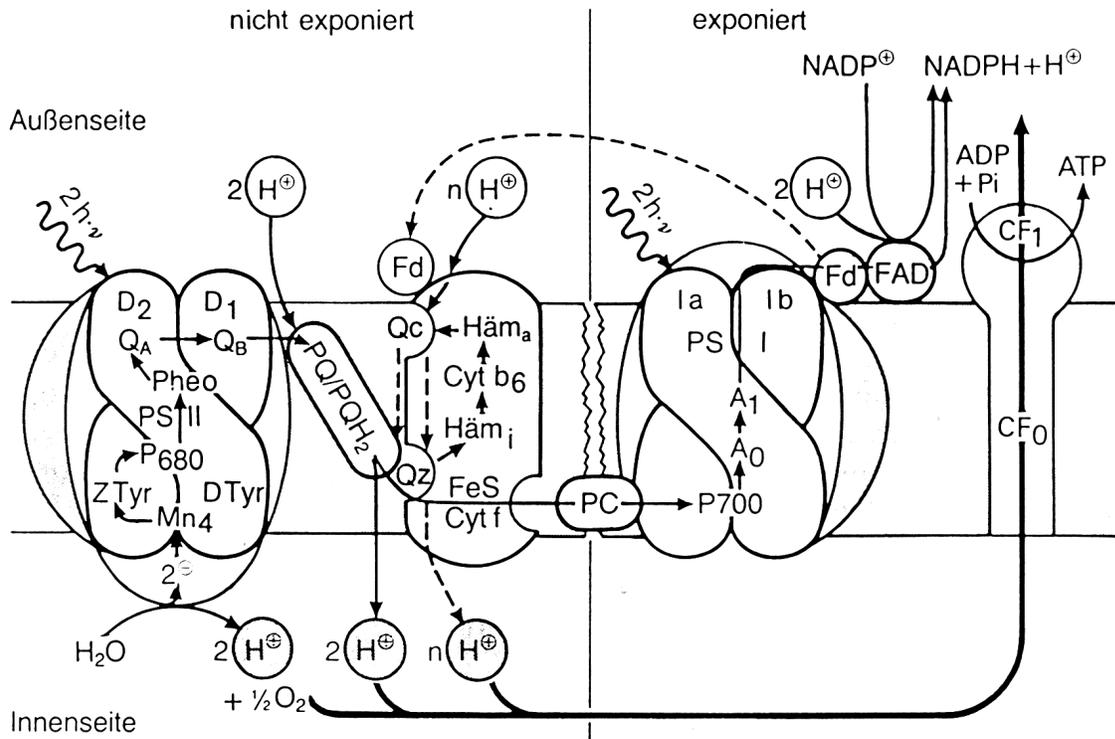


Abbildung 0.1: Photosynthetischer Elektronentransport, Aufbau eines Protonengradienten und Phosphorylierung an der Thylakoidmembran der Chloroplasten (schematisch), aus NULTSCH (1991).

Die Stöchiometrie des Protonentransportes durch den Cyt b<sub>6</sub>f-Komplex ist nicht geklärt, n liegt zwischen 0 und 2, wodurch sich eine maximale Protonenzahl von 6 pro Zyklus ergibt.

Eine wesentliche Grundlage für das Schema der Vorgänge an der Thylakoidmembran (Abb. 0.1) ist die chemiosmotische Hypothese, die von P. MITCHELL aufgestellt wurde (MITCHELL, 1961).

Alle Versuche im Praktikum wurden an den Thylakoiden von Erbsen vorgenommen, die jeweils entsprechend der Versuchsanleitung frisch präpariert wurden.

# 1 Messung der O<sub>2</sub>-Produktion (Hill-Reaktion) in der Sauerstoffelektrode

## 1.1 Versuchsziel

Nachweis des Elektronentransportes in Abhängigkeit vom Kopplungsgrad der Reaktion.

## 1.2 Durchführung

Die Versuchsansätze wurden nach Versuchsanleitung gemäß dem Pipettierschema Tab. 1.1 direkt in die Reaktionskammer der O<sub>2</sub>-Elektrode pipettiert. Nach dem Erreichen eines konstanten Schreiber-Signals wurde die Reaktion durch Belichtung gestartet.

	Ansatz Nr.						
	1	2	3	4	5	6	7
Lösung B	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075
ADP	0.15	0.15					
Ferricyanid		0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
NH <sub>4</sub> Cl				0.005	0.02	0.05	0.15
Wasser	1.125	0.825	0.975	0.97	0.955	0.925	0.825
Thylakoide	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15

Tabelle 1.1: Pipettierschema für die Versuchsansätze (alle Angaben in ml)

	Ansatz Nr.						
	1	2	3	4	5	6	7
$l_{\text{mess}}/\text{mm}$	13	35	11	19	53	46	50
$t/\text{min}$	6	4	5	3	6	4	4

Tabelle 1.2: Schreibermitschriften

Der Schreiber wurde auf einen Vorschub von 10 mm · min<sup>-1</sup> eingestellt, die Kalibrierung ergab einen Schreiberweg

$$l_{\text{eich}} = 13.9 \text{ cm} \quad \text{entsprechend} \quad n_{\text{O}_2, \text{eich}} = 0.276 \mu\text{mol}$$

Der Chlorophyllgehalt  $c_{\text{Chl}}$  betrug am Versuchstag

$$c_{\text{Chl}} = 1.0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$$

## 1.3 Berechnungen

Die Kalibrierung der Schreiberaufzeichnungen erfolgte, wie in der Versuchsanleitung unter "Kalibrierung der O<sub>2</sub>-Elektrode" angegeben, über Zugabe einer ausreichenden Menge Natriumdithionit (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), die zum Verbrauch allen in der Lösung befindlichen Sauerstoffs führte. Der Schreiberweg  $l_{\text{eich}}$  zwischen O<sub>2</sub>-gesättigtem und O<sub>2</sub>-freiem Wasser entspricht einer Sauerstoffmenge  $n_{\text{O}_2, \text{eich}} = 0.276 \mu\text{mol}$  pro Bezugsvolumen  $V_{\text{bez}} = 1 \text{ ml}$ .

Aus dem Verhältnis zwischen dem Schreiberweg  $l_{\text{eich}}$  für die Kalibrierung und  $l_{\text{mess}}$  für die Messungen (Gl. 4.1) kann die in den jeweiligen Versuchsansätzen entstandene Sauerstoffmenge  $n_{\text{O}_2, \text{mess}}$  bezogen auf ein Meßvolumen  $V_{\text{mess}} = 4.5 \text{ ml}$  errechnet werden (Gl. 1.2).

$$\frac{l_{\text{eich}} \cdot V_{\text{bez}}}{n_{\text{O}_2, \text{eich}}} = \frac{l_{\text{mess}} \cdot V_{\text{mess}}}{n_{\text{O}_2, \text{mess}}} \quad (1.1)$$

$$n_{\text{O}_2, \text{mess}} = \frac{l_{\text{mess}} \cdot V_{\text{mess}} \cdot n_{\text{O}_2, \text{eich}}}{l_{\text{eich}} \cdot V_{\text{bez}}} \quad (1.2)$$

Die für die Sauerstoffmenge  $n_{\text{O}_2, \text{mess}}$  nach Gl. (1.2) errechneten Werte ergaben sich im Versuch für eine Zeit  $t$  (wie in Tab. 1.2 angegeben) und eine Chlorophyllmasse  $m_{\text{Chl}} = 0.15 \mu\text{g}$ . Um wie gefordert die Elektronentransportraten  $J_{\text{el}}$  anzugeben, war ein letzter Rechenschritt nach Gl. (1.3) notwendig.

$$J_{\text{el}} = \frac{n_{\text{O}_2, \text{mess}} \cdot 60}{t \cdot m_{\text{Chl}}} \quad [J_{\text{el}}] = \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl} \cdot \text{h}^{-1} \quad (1.3)$$

#### 1.4 Ergebnisse

Für die Ergebnisse vgl. Tab. 1.3

	Ansatz Nr.						
	1	2	3	4	5	6	7
$J_{\text{el}}^1$	-7.7	31.3	7.9	22.6	31.6	41.1	44.7

Tabelle 1.3: Ergebnisse

#### 1.5 Diskussion

**Ansatz 1** Da im Ansatz eins kein Ferricyanid ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) zugesetzt wurde, lief hier die (nach ihrem Entdecker so benannte) MEHLER-Reaktion ab (vgl. Abb. 1.1).

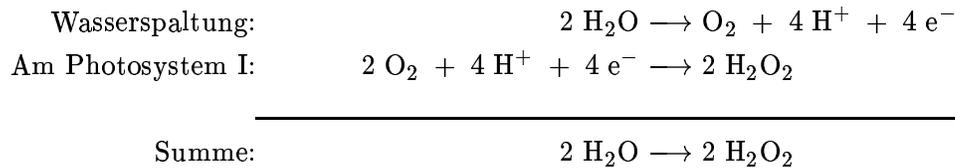


Abbildung 1.1: MEHLER-Reaktion

In der Summe wird dabei kein Sauerstoff gebildet, sondern in geringem Maße verbraucht, da er als terminaler Elektronen-Acceptor zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduziert wird. Aus diesem  $\text{O}_2$ -Verbrauch resultiert auch die negative Elektronentransportrate  $J_{\text{el}}$  (vgl. Tab. 1.3).

**Ansatz 2** Im Ansatz zwei waren alle Komponenten der klassischen HILL-Reaktion — ADP (K-ADP), ein Elektronen-acceptor (Ferricyanid,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) und Phosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) — anwesend.

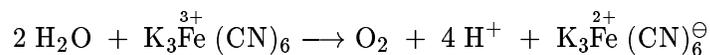


Abbildung 1.2: HILL-Reaktion

Die ablaufende gekoppelte Reaktion (Abb. 1.2) wurde 1937 vom englischen Chemiker ROBERT HILL entdeckt (VOET und VOET, 1995). Die hohe Elektronentransportrate ist korreliert mit den für die Reaktion idealen Bedingungen hinsichtlich des Vorhandenseins der Substrate und der Beleuchtung. Sie entspricht theoretisch den in vivo-Werten.

<sup>1</sup>in  $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chlorophyll} \cdot \text{h}^{-1}$

Besondere Bedeutung kommt der HILL-Reaktion deshalb zu, weil sie zu wichtigen Erkenntnissen im Zusammenhang mit den Prozessen der Lichtreaktion der Photosynthese führte. Diese Ergebnisse seien im folgenden kurz aufgelistet (HERDER VERL., 1983ff.):

1.  $O_2$  entsteht ohne gleichzeitige  $CO_2$ -Reduktion
2.  $O_2$  wird aus  $H_2O$  (nicht aus  $CO_2$ ) gebildet
3. Die Enzyme der Photosynthese sind in den Chloroplasten lokalisiert.
4. Die primäre Lichtreaktion erfolgt im Transfer eines Elektrons von einem Elektronendonator auf einen Elektronenacceptor (hier Ferricyanid) gegen ein chemisches Energiegefälle.

**Ansatz 3** Da Ansatz drei kein ADP zugesetzt wurde, ist die hier ablaufende Reaktion ungekoppelt, verläuft also ohne ATP-Produktion. Da der  $CF_0CF_1$ -Komplex (die ATP-Synthase) für den Transport der Protonen aus dem Thylakoidlumen in das Stroma verantwortlich ist, kommt es hier zu einer Akkumulation der Protonen im Thylakoidlumen. Das verlangsamt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Elektronentransportkette — die Übertragung eines Elektrons vom Plastochinon-Pool auf die  $Q_z$ -site des Cyt f des Cyt  $b_6f$ -Komplexes —, da er pH-abhängig ist, weil er Protonen in das Thylakoidlumen abgibt. Daraus ist die sehr niedrige Elektronentransportrate erklärbar.

**Ansätze 4–7** Die Ansätze vier bis sieben unterscheiden sich nur in der Konzentration des zugesetzten Entkopplers ( $NH_4Cl$ ). Die Wirkung des Entkopplers beruht auf dem Wegfangen von Protonen im Thylakoidlumen und deren gleichzeitiger Freisetzung im Stroma. Für detaillierte Beschreibung vgl. Abb. 2.2, S. 7. Durch das Wegfangen der Protonen im Thylakoidlumen wird der geschwindigkeitsbestimmende, pH-abhängige Schritt der Elektronentransportkette beschleunigt.

Interessant ist, daß die Wirkung des Entkopplers ab einer bestimmten Konzentration einer Sättigung zuzustreben scheint. Zwar ist zwischen den Ansätzen sechs und sieben eine weitere Steigerung der Elektronentransportrate zu verzeichnen, doch ist sie deutlich geringer als die Steigerung zwischen den Ansätzen fünf und sechs, obwohl im Verhältnis eine größere Menge des Entkopplers zugesetzt wurde.

## 2 Nachweis der $\Delta\text{pH}$ -Bildung mit der $\text{H}^+$ -Elektrode

### 2.1 Versuchsziel

Messung der  $\text{H}^+$ -Aufnahme der Thylakoide (Ansätze 1–3) und der Elektronentransportraten (Ansätze 4–6) über den Aufbau eines  $\text{pH}$ -Gradienten über die Thylakoidmembran.

### 2.2 Durchführung

Die Versuchsansätze wurden nach Versuchsanleitung gemäß dem Pipettierschema Tab. 2.1 direkt in die Reaktionskammer der  $\text{O}_2$ -Elektrode pipettiert und mit 10 mM  $\text{HCl}$ - bzw.  $\text{NaOH}$ -Lösung auf einen Ausgangs- $\text{pH}$ -Wert  $\text{pH}_{\text{anf}} = 6.7$  gebracht.

	Ansatz Nr.					
	1	2	3	4	5	6
KCl	4.85	4.82	4.70	4.80	4.77	4.65
Ferricyanid				0.05	0.05	0.05
$\text{NH}_4\text{Cl}$		0.03	0.15		0.03	0.15
Thylakoide	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15

Tabelle 2.1: Pipettierschema für die Versuchsansätze (alle Angaben in ml)

Der Schreiber wurde wie in der Versuchsanleitung beschrieben eingestellt und gestartet. (Vorschub:  $20 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$  für die Ansätze 1–3,  $2 \text{ mm} \cdot \text{sec}^{-1}$  für die Ansätze 4–6) Nachdem sich ein konstantes Signal eingestellt hatte, wurde belichtet, ebenfalls ein konstantes Signal abgewartet und das Licht wieder ausgeschaltet. Dieser Meßvorgang wurde für jeden Ansatz zweimal durchgeführt, danach wurde die Pufferkapazität im Meßbereich für den Ansatz durch Zugabe einer definierten Menge  $V_{\text{HCl, mM}} = 10 \mu\text{l HCl}$  bestimmt.

	Ansatz Nr.					
	1		2		3	
Messung $y/\text{cm}$	3.7	3.4	1.9	2.2	1.6	1.7
Eichung $y/\text{cm}$	6.4		10.0		8.7	

	Ansatz Nr.					
	4		5		6	
Messung $y/\text{cm}$	8.3	6.7	4.3	5.5	6.0	3.6
$t/\text{sec}$	40	35	10	15	8	5
Eichung $y/\text{cm}$	8.5		9.7		10.8	

Tabelle 2.2: Schreibermitschriften

Der Chlorophyllgehalt  $c_{\text{Chl}}$  betrug am Versuchstag

$$c_{\text{Chl}} = 1.1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$$

### 2.3 Berechnungen

**$\text{H}^+$ -Aufnahme der Thylakoide (Ansätze 1–3)** Aus der Eichung der Schreiberaufzeichnungen durch die Zugabe eines definierten Volumens  $V_{\text{HCl, mM}}$   $\text{HCl}$  konnte direkt die Stoffmenge der aufgenommenen Protonen errechnet werden:

$$n_{\text{H}^+, \text{mess}} = \frac{l_{\text{mess}} \cdot 0.1}{l_{\text{kal}}} \quad [n_{\text{H}^+, \text{mess}}] = \mu\text{mol} \quad (2.1)$$

Die so erhaltene Stoffmenge  $n_{\text{H}^+, \text{mess}}$  an Protonen wurde noch ins Verhältnis zur im Ansatz enthaltenen Stoffmenge Chlorophyll gesetzt. Dabei ging der Faktor 1.1 als Korrekturfaktor für die Ausgangskonzentration  $c_{\text{Chl}}$  ein.

$$A_{\text{H}^+} = \frac{n_{\text{H}^+, \text{mess}} \cdot 900}{0.15 \cdot 1.1 \cdot 1000} \quad [A_{\text{H}^+}] = \mu\text{mol H}^+ \cdot \mu\text{mol}^{-1} \text{ Chl} \quad (2.2)$$

Für die Ergebnisse vgl. Tab. 2.3.

**e<sup>-</sup>-Transportraten (Ansätze 4–6)** Zunächst wurde analog zur Gl. (2.1) die Menge der transportierten Elektronen errechnet:

$$n_{\text{H}^+/\text{e}^-, \text{mess}} = \frac{l_{\text{mess}} \cdot 0.1}{l_{\text{kal}}} \quad [n_{\text{H}^+/\text{e}^-, \text{mess}}] = \mu\text{mol} \quad (2.3)$$

Die so erhaltene Menge transportierter Elektronen wurde auf eine Zeit von einer Stunde (3600 Sekunden) hochgerechnet, um die Elektronentransportrate zu  $J_{\text{el}}$  erhalten:

$$J_{\text{el}} = \frac{n_{\text{H}^+/\text{e}^-, \text{mess}} \cdot 3600}{t \cdot 0.15 \cdot 1.1} \quad [J_{\text{el}}] = \mu\text{mol e}^- \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Chl} \cdot \text{h}^{-1} \quad (2.4)$$

Für die Ergebnisse vgl. ebenfalls Tab. 2.3.

## 2.4 Ergebnisse

	Ansatz Nr.					
	1		2		3	
$A_{\text{H}^+}^2$	0.32	0.29	0.10	0.12	0.10	0.11
	Ansatz Nr.					
	4		5		6	
$J_{\text{el}}^3$	53	49	97	82	152	145

Tabelle 2.3: Ergebnisse

## 2.5 Diskussion

**Ansätze 1–3** In den Ansätzen eins bis drei läuft die nach ihrem Entdecker benannte MEHLER-Reaktion ab (vgl. Abb. 2.1), die dadurch gekennzeichnet ist, daß die Elektronen von PS I mangels eines geeigneteren Elektronen-Acceptors auf Sauerstoff als terminalen Elektronen-Acceptor übertragen werden.

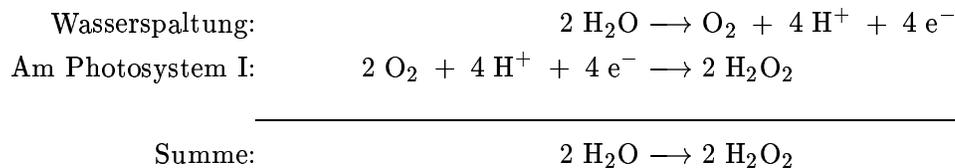


Abbildung 2.1: MEHLER-Reaktion

<sup>2</sup>in  $\mu\text{mol H}^+ \cdot \mu\text{mol}^{-1}$  Chlorophyll

<sup>3</sup>in  $\mu\text{mol e}^- \cdot \text{mg}^{-1}$  Chlorophyll  $\cdot \text{h}^{-1}$

In der Summe wird also gar kein Sauerstoff gebildet. Da alle bei der Wasserspaltung entstehenden Protonen zur Reduktion des Wassers benötigt werden, tragen nur die vektoriellen Protonen (die Protonen, die vom Stroma über die Thylakoidmembran in das Thylakoidlumen transportiert werden) zum pH-Gradienten bei, der im Dunkeln schnell wieder zusammenbricht.

Mit steigender Entkoppler-Konzentration wird der pH-Gradient geringer, da der Entkoppler dadurch, daß er im Thylakoidlumen Protonen wegfängt und stromaseitig freisetzt, den pH-Gradienten zerstört.

**Ansätze 4–6** In den Ansätzen vier bis sechs war als terminaler Elektronenacceptor der klassische Hill-Acceptor Ferricyanid ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) anwesend. Daher ist die Geschwindigkeit des Elektronentransportes und mit ihr korreliert die Elektronentransportrate nicht mehr durch den wenig effizienten Übergang des Elektrons auf Sauerstoff als terminalen Acceptor abhängig. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Elektronentransportkette — der Übergang der Elektronen aus dem PQ-Pool auf die  $\text{Q}_z$ -site des Cyt f des Cyt  $\text{b}_6\text{f}$ -Komplexes — ist pH-abhängig, da er Protonen in das Thylakoidlumen abgibt. Daher wird die Elektronentransportrate bei zunehmender Entkopplerkonzentration und -wirkung beschleunigt, da der Entkoppler Protonen im Thylakoidlumen wegfängt und stromaseitig freisetzt (vgl. Abb. 2.2).

**Wirkung von Ammonium** Die entkoppelnde Wirkung von Ammonium beruht auf der Protolyse des Ammoniums in wässriger Lösung und der unterschiedlichen Membrangängigkeit der protonierten und der nicht protonierten Form: Während das Ammonium-Ion  $\text{NH}_4^\oplus$  aufgrund seiner großen Hydrat-Hülle nicht membrangängig ist, kann  $\text{NH}_3$  problemlos durch die Membran diffundieren. In wässriger Lösung liegt das Gleichgewicht der protonierten und nicht protonierten Form auf der Seite des  $\text{NH}_4^\oplus$ .

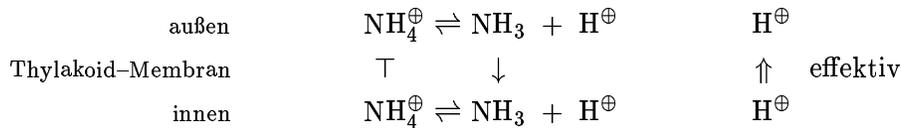


Abbildung 2.2: Entkoppler-Wirkung von Ammonium

Wie in Abb. 2.2 gezeigt, diffundiert  $\text{NH}_3$  durch die Membran in das Thylakoidlumen und bindet dort die freien Protonen. Gleichzeitig werden durch die stromaseitige Verschiebung des Protolyse-Gleichgewichtes Protonen im Stroma frei. Effektiv wirkt Ammonium also wie ein Protonen-Austauscher zwischen Stroma und Thylakoidlumen, auch wenn dabei faktisch keine Protonen über die Membran transportiert, sondern lediglich stromaseitig freigesetzt und im Thylakoidlumen gebunden werden.

### 3 Nachweis der $\Delta\text{pH}$ -Bildung mit 9-Aminoacridin

#### 3.1 Versuchsziel

Ermittlung des pH-Gradienten durch die Lichtreaktion in Abhängigkeit vom Kopplungsgrad.

#### 3.2 Durchführung

Die Versuchsansätze wurden nach Versuchsanleitung gemäß dem Pipettierschema Tab. 3.1 direkt in die Küvette des Fluorimeters pipettiert.

	Ansatz Nr.				
	1	2	3	4	5
Rkt.gemisch	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1
ADP		0.1			
NH <sub>4</sub> Cl			0.002	0.01	0.1
Wasser	0.87	0.77	0.868	0.86	0.77
Thylakoide	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035

Tabelle 3.1: Pipettierschema für die Versuchsansätze (alle Angaben in ml)

Aus der Vermessung des Ansatzes ohne 9-Aminoacridin resultierte der Nullwert (blank), durch Zugabe von 9-Aminoacridin (5  $\mu\text{l}$ ) stellte sich der Maximalwert ein. Die eigentliche Messung wurde durch Belichtung mit Anregungslicht (390 nm) gestartet.

Ansatz Nr.	1		2		3		4		5	
$l_{\text{mess}}/\text{cm}$	2.8	2.6	1.0	0.9	2.1	1.6	1.0	0.7	0	0
$l_{\text{ges}}/\text{cm}$	11.0		9.4		13.1		10.3		9.6	

Tabelle 3.2: Schreibermitschriften

#### 3.3 Berechnungen

Die pH-Werte für die Außen- (a) und Innenphase (i) errechnen sich wie folgt:

$$\text{pH}_a = \text{pK} + \lg \left( \frac{[\text{A}]_a}{[\text{AH}^+]_a} \right) \quad (3.1)$$

$$\text{pH}_i = \text{pK} + \lg \left( \frac{[\text{A}]_i}{[\text{AH}^+]_i} \right) \quad (3.2)$$

Somit ergibt sich für die pH-Differenz ( $\Delta\text{pH}$ ) zwischen Innen- und Außenphase

$$\begin{aligned} \Delta\text{pH} &= \text{pH}_a - \text{pH}_i \\ &= \lg \left( \frac{[\text{AH}^+]_i}{[\text{AH}^+]_a} \right) - \lg \left( \frac{[\text{A}]_a}{[\text{A}]_i} \right) \end{aligned} \quad (3.3)$$

Unter den gegebenen Bedingungen sind  $[\text{A}]_{i,a}$  und damit auch  $\lg ([\text{A}]_a/[\text{A}]_i)$  vernachlässigbar. Gl. (3.3) vereinfacht sich dadurch zu:

$$\Delta\text{pH} = \lg \left( \frac{[\text{AH}^+]_i}{[\text{AH}^+]_a} \right) \quad (3.4)$$

Der Zusammenhang zur im Versuch gemessenen Fluoreszenzlöschung  $L$  ist wie folgt gegeben:

$$\begin{aligned} [\text{AH}^+]_i &= \frac{L}{V_i} \\ [\text{AH}^+]_a &= \frac{1-L}{V_a} \end{aligned} \quad (3.5)$$

Dabei bedeuten  $V_i$  das Thylakoidinnenvolumen,

$$\begin{aligned} V_{i,\text{mg}} &= 50 \mu\text{l} \\ V_i &= \frac{50}{0.035} = 1.75 \mu\text{l} \end{aligned} \quad (3.6)$$

und  $V_a = 2970 \mu\text{l}$  das Volumen der Außenphase.  $L$  ergibt sich aus den auf dem Meßprotokoll des Schreibers gemessenen Werten für  $l_{\text{mess}}$  und  $l_{\text{ges}}$  über die Beziehung

$$L = \frac{l_{\text{mess}}}{l_{\text{ges}}} \quad (3.7)$$

Für die Werte für  $L$  vgl. Tab. 3.3.

Ansatz Nr.	1		2		3		4		5	
$L$	0.25	0.24	0.11	0.10	0.16	0.12	0.10	0.07	0	0
$\Delta\text{pH}$	1.31	1.26	0.85	0.80	1.05	0.92	0.81	0.64	0	0

Tabelle 3.3: Berechnung des  $\Delta\text{pH}$

Durch Kombination von Gl. (3.4) und (3.5) ergibt sich für die Ermittlung des  $\Delta\text{pH}$  im Experiment

$$\Delta\text{pH} = \lg \left( \frac{L}{V_i} \cdot \frac{V_a}{(1-L)} \right) \quad (3.8)$$

### 3.4 Ergebnisse

Ansatz Nr.	1		2		3		4		5	
$\Delta\text{pH}$	1.31	1.26	0.85	0.80	1.05	0.92	0.81	0.64	0	0

Tabelle 3.4: Ergebnisse

### 3.5 Diskussion

**Ansatz 1** Die Reaktion im Ansatz 1 ist ungekoppelt, d. h. es findet keine ATP-Synthese statt, da im Ansatz kein ADP als Substrat der ATP-Synthase vorhanden war. Aus dieser Tatsache resultiert auch der hohe pH-Gradient über der Membran, da zwar Elektronen über die Elektronentransportkette geleitet und somit Protonen in das Thylakoidlumen gepumpt wurden, aber keine Protonen über den  $\text{CF}_0\text{CF}_1$ -Komplex in das Stroma zurückgelangen können.

**Ansatz 2** Dem Ansatz 2 war als einzigem ADP zugesetzt worden, so daß hier eine gekoppelte Reaktion mit ATP-Synthese am  $\text{CF}_0\text{CF}_1$ -Komplex und dem damit verbundenen Protonenstrom vom Thylakoidlumen in das Stroma abläuft. Der hier erhaltene pH-Gradient sollte daher den in vivo-Werten etwa entsprechen.

**Ansätze 3–5** Die Ansätze drei bis fünf zeichnen sich durch eine steigende Entkoppler-Konzentration aus, die Reaktionen sind also entkoppelt. Die für den pH-Gradienten gegenüber Ansatz zwei zunächst höheren Werte (Ansatz drei) sind dadurch zu erklären, daß den Ansätzen 3–5 kein ADP zugesetzt wurde. Die Reaktionen laufen daher bei geringer Entkoppler-Konzentration vergleichbar Ansatz eins als ungekoppelte Reaktionen ab.

Die sinkenden Werte für den pH-Gradienten über der Membran bei den Ansätzen vier und fünf sind auf die Wirkung des Entkopplers zurückzuführen, der Protonen aus dem Thylakoid-Lumen wegfängt und gleichzeitig über das Protolyse-Gleichgewicht Protonen im Stroma freisetzt und somit den pH-Gradienten zerstört.

**Abschätzung des pH-Wertes in Zellen** Amine wirken erst ab einer bestimmten Konzentration entkoppelnd. In geringeren Konzentrationen können sie dagegen als Indikatoren für pH-Gradienten dienen, da die Verteilung des Amins über die Membran pH-abhängig ist. Mit radioaktiv markierten Aminen wie [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylamin könnte man den pH-Wert in Zellen dadurch abschätzen, daß man quantitativ über die Strahlungsmenge die Menge des Amins in der Zelle bestimmt und mit Referenzmessungen an bekannten pH-Gradienten über Membran vergleicht.

## 4 Photophosphorylierung, ATP/2e<sup>-</sup>-Stöchiometrie

### 4.1 Versuchsziel

Ermittlung der ATP/2e<sup>-</sup>-Stöchiometrie bei der Photophosphorylierung und der Einflußnahme von Entkopplern auf die ATP-Bildung und die Elektronentransportraten.

### 4.2 Durchführung

Die Versuchsansätze wurden nach Versuchsanleitung gemäß dem Pipettierschema Tab. 4.1 ohne ADP in die Reaktionskammer der O<sub>2</sub>-Elektrode pipettiert.

Ansatz Nr.	1	2	3	4	5	6
Rkt.gemisch	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1
NH <sub>4</sub> Cl		0.01	0.03	0.15		
DCMU					0.3	
Wasser	2.1	2.09	2.07	1.95	1.8	2.1
Thylakoide	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
ADP	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15

Tabelle 4.1: Pipettierschema (alle Angaben im ml)

Die weitere Durchführung folgte der Beschreibung, der Schreiber wurde auf einen Vorschub von 10 mm · min<sup>-1</sup> eingestellt, die Kalibrierung ergab einen Schreiberweg

$$l_{\text{eich}} = 16.5 \text{ cm} \quad \text{entsprechend} \quad n_{\text{O}_2, \text{eich}} = 0.276 \mu\text{mol}$$

Die ATP-Bestimmung erfolgte am Luminometer mit dem Luciferin/Luciferase-System. Der Chlorophyllgehalt  $c_{\text{Chl}}$  betrug am Versuchstag

$$c_{\text{Chl}} = 1.0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$$

Ansatz Nr.	1		2		3		4		5		6	
$l_{\text{mess}}/\text{cm}$	3	2.8	3.9	3.5	4	4.3	5	4.7	0	0	0	0
$t/\text{min}$	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
$l_{\text{ges}}/\text{cm}$	4.5	4	5.5	4.8	5.5	6	7	6.5	0	0	0	0

Tabelle 4.2: Schreibermitschriften

Ansatz Nr.	1		2		3		4		5		6	
$E/\text{rel. LE}$	1175	1130	1305	1155	510	320	80	50	43	75	18	40

Tabelle 4.3: ATP-Messung

$V_{\text{ATP}}/\mu\text{l}$	10		20		30		40	50
$E/\text{rel. LE}$	430	325	655	633	880	1000	1240	1570

Tabelle 4.4: Eichgerade für die ATP-Messung

### 4.3 Berechnungen

**Elektronentransportraten** Die Kalibrierung der Schreiberaufzeichnungen erfolgte, wie in der Versuchsanleitung unter "Kalibrierung der O<sub>2</sub>-Elektrode" angegeben, über Zugabe einer ausreichenden Menge Natriumdithionit (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), die zum Verbrauch allen in der Lösung befindlichen Sauerstoffs führte. Der Schreiberweg  $l_{\text{eich}}$  zwischen O<sub>2</sub>-gesättigtem und O<sub>2</sub>-freiem Wasser entspricht einer Sauerstoffmenge  $n_{\text{O}_2,\text{eich}} = 0.276 \mu\text{mol}$  pro Bezugsvolumen  $V_{\text{bez}} = 1 \text{ ml}$ .

Aus dem Verhältnis zwischen dem Schreiberweg  $l_{\text{eich}}$  für die Kalibrierung und  $l_{\text{mess}}$  für die Messungen (Gl. 4.1) kann die in den jeweiligen Versuchsansätzen entstandene Sauerstoffmenge  $n_{\text{O}_2,\text{mess}}$  bezogen auf ein Meßvolumen  $V_{\text{mess}} = 4.5 \text{ ml}$  errechnet werden (Gl. 4.2).

$$\frac{l_{\text{eich}} \cdot V_{\text{bez}}}{n_{\text{O}_2,\text{eich}}} = \frac{l_{\text{mess}} \cdot V_{\text{mess}}}{n_{\text{O}_2,\text{mess}}} \quad (4.1)$$

$$n_{\text{O}_2,\text{mess}} = \frac{l_{\text{mess}} \cdot V_{\text{mess}} \cdot n_{\text{O}_2,\text{eich}}}{l_{\text{eich}} \cdot V_{\text{bez}}} \quad (4.2)$$

Die für die Sauerstoffmenge  $n_{\text{O}_2,\text{mess}}$  nach Gl. (4.2) errechneten Werte ergaben sich im Versuch für eine Zeit  $t = 3 \text{ min}$  (wie in Tab. 4.2 angegeben) und eine Chlorophyllmasse  $m_{\text{Chl}} = 0.15 \mu\text{g}$ . Um wie gefordert die Elektronentransportraten  $J_{\text{el}}$  anzugeben, war ein letzter Rechenschritt nach Gl. (4.3) notwendig.

$$J_{\text{el}} = \frac{n_{\text{O}_2,\text{mess}} \cdot 60}{t \cdot m_{\text{Chl}}} \quad (4.3)$$

$$[J_{\text{el}}] = \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Chlorophyll} \cdot \text{h}^{-1}$$

**Stoffmenge an ATP** Die ATP-Bestimmung erfolgte im Luminometer gemäß Versuchsbeschreibung (Anhang 2). Zunächst wurde die Lichtemission (in relativen Lichteinheiten, rel. LE) für die einzelnen Proben des Versuches gemessen.

Für die Eichkurve wurden der Probe mit dem niedrigsten Wert der Lichtemission definierte Mengen einer durch 1:1000-Verdünnung hergestellten  $0.1 \mu\text{M}$  ATP-Lösung zugesetzt. Von den erhaltenen Werten wurde der Extinktionswert des vorher vermessenen verwendeten Ansatzes abgezogen, das Ergebnis graphisch aufgetragen (Abb. 4.1) und über lineare Regression

$$y = ax + b$$

$$y = (a \pm u_a)x + (b \pm u_b) \quad (4.4)$$

eine Eichgerade rechnerisch bestimmt. Mit den Werten für  $a$ ,  $u_a$ ,  $b$  und  $u_b$  (Tab. 4.5) ergibt sich nach Gl. (4.4) für die Eichgerade:

$$y = (64 \pm 30)x + (295 \pm 13) \quad (4.5)$$

Nach Umstellung und Gleichsetzung

$$y = E$$

$$x = n_{\text{ATP,ali}}$$

ließen sich die ATP-Stoffmengen  $n_{\text{ATP,kuv}}$  (in pmol) der Versuche direkt errechnen:

$$n_{\text{ATP,kuv}} = \frac{E - 295}{64} \quad [n_{\text{ATP,kuv}}] = \text{pmol} \quad (4.6)$$

Die so erhaltenen Werte entsprechen der in der Küvette enthaltenen Stoffmenge ATP. Da bei diesem Versuch  $20 \mu\text{l}$  der verdünnten Probe zum Einsatz kamen, müssen die Werte noch auf die ATP-Menge  $n_{\text{ATP}}$  (in nmol!) im Versuchsansatz hochgerechnet werden:

$$n_{\text{ATP}} = \frac{500 \cdot 225 \cdot n_{\text{ATP,kuv}}}{1000} \quad [n_{\text{ATP}}] = \text{nmol} \quad (4.7)$$

$a$	$u_a$	$b$	$u_b$
64	30	295	13

Tabelle 4.5: Lineare Regression für die ATP-Eichgerade

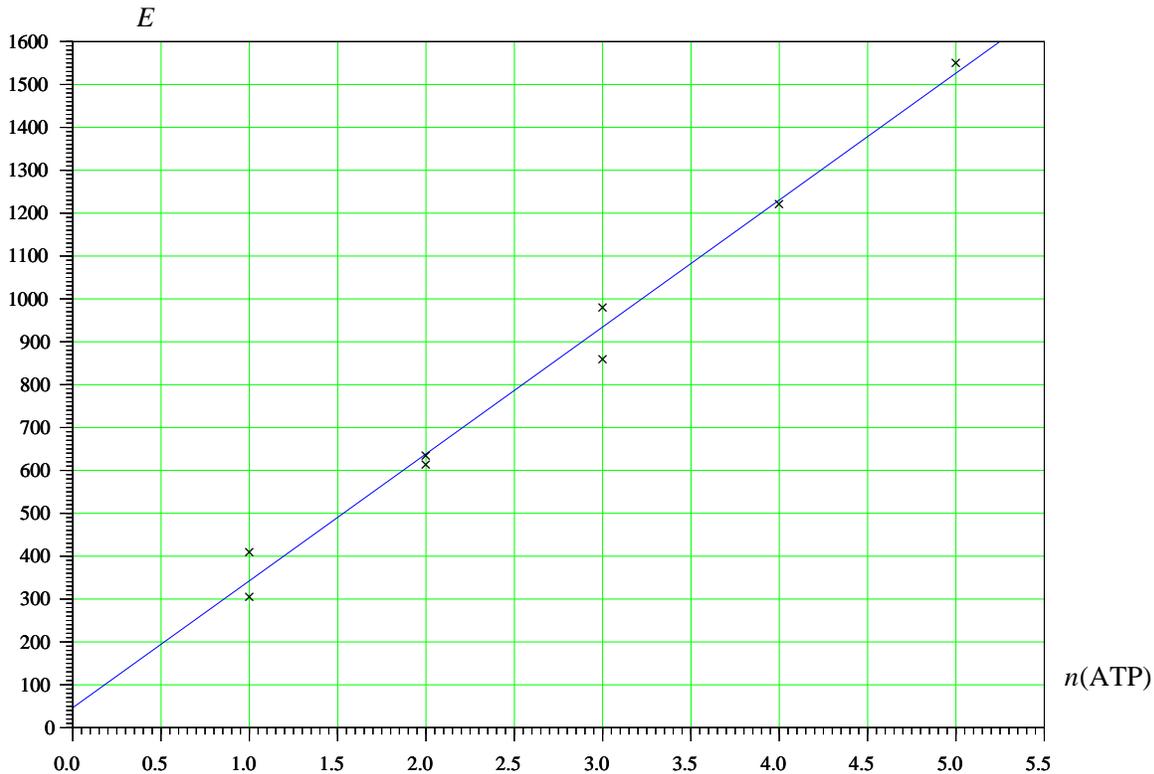


Abbildung 4.1: Eichkurve für Versuch 4:  $n(\text{ATP})$  in pmol,  $E$  in rel. Lichteinheiten

**ATP/ $2e^-$ -Stöchiometrie** Zur Berechnung des stöchiometrischen Verhältnisses  $\text{ATP}/2e^-$  konnte die insgesamt gebildete Menge an  $\text{O}_2$  herangezogen werden, da je Elektronenpaar ein Molekül  $\text{O}_2$  gebildet wird.

Zur Bestimmung der insgesamt gebildeten Sauerstoff-Menge  $n_{\text{O}_2, \text{ges}}$  wurden die Werte für den Gesamt-Schreiberweg  $l_{\text{ges}}$  aus Tab. 4.2 in die folgende, aus Gl. (4.2) hervorgegangene Gleichung eingesetzt:

$$n_{\text{O}_2, \text{ges}} = \frac{l_{\text{ges}} \cdot V_{\text{mess}} \cdot n_{\text{O}_2, \text{eich}}}{l_{\text{eich}} \cdot V_{\text{bez}}} \quad (4.8)$$

Die  $\text{ATP}/2e^-$ -Stöchiometrie

$$\frac{\text{ATP}}{2 e^-} = \frac{n_{\text{ATP}}}{n_{\text{O}_2, \text{ges}}} \quad (4.9)$$

ergab sich zu den in Tab. 4.7 angegebenen Werten.

#### 4.4 Ergebnisse

Zur Darstellung der Ergebnisse vgl. Tab. 4.7.

#### 4.5 Diskussion

**Ansatz 1** Der erste Ansatz war dahingehend vollständig, daß alle zur ATP-Bildung notwendigen Substrate — ADP (K-ADP), Phosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) und ein Elektronenacceptor

Ansatz Nr.	1		2		3	
$J_{el}$	30.1	28.1	39.1	35.1	40.1	43.2
$n_{O_2,ges}/nmol$	339	301	414	361	414	452
$n_{ATP}/nmol$	429	412	478	421	176	104
ATP/ $2e^-$	1.3	1.4	1.2	1.2	0.4	0.2

Ansatz Nr.	4		5		6	
$J_{el}$	50.2	47.2	0	0	0	0
$n_{O_2,ges}/nmol$	527	489	0	0	0	0
$n_{ATP}/nmol$	13	1	–	11	–	–
ATP/ $2e^-$	0	0	0	0	0	0

Tabelle 4.6: Berechnung der ATP/ $2e^-$ -Stöchiometrie

Ansatz Nr.	1		2		3		4		5		6	
$J_{el}$	30.1	28.1	39.1	35.1	40.1	43.2	50.2	47.2	0	0	0	0
ATP/ $2e^-$	1.3	1.4	1.2	1.2	0.4	0.2	0	0	0	0	0	0

Tabelle 4.7: Ergebnisse

(Methylviologen) — im Reaktionsgemisch enthalten waren. Den idealen Bedingungen hinsichtlich aller Faktoren, insbesondere hinsichtlich der Beleuchtung, entspricht das im Versuch höchste ATP/ $2e^-$ -Verhältnis. Dem rechnerischen Maximalwert von  $1.5^4$  kommen die Ergebnisse im Versuch als maximale real mögliche Ausbeute schon sehr nahe. Dieser hohen Ausbeute entspricht auch die geringste Elektronentransportrate  $J_{el}$  bezogen auf die Ansätze 1–4.

**Ansätze 2–4** Die Ansätze zwei bis vier unterscheiden sich bezüglich ihrer Zusammensetzung lediglich in ihrer steigenden Entkoppler-Konzentration von Ansatz 1. Analog zur steigenden Konzentration des Entkopplers  $NH_4Cl$  wird das ATP/ $2e^-$ -Verhältnis kleiner und liegt in Ansatz 4 — wegen der verschwindenden Werte für die ATP-Menge — durch Rundung schließlich bei 0. Die verringerte ATP-Menge kommt durch das Wegfangen der Protonen im Thylakoidlumen durch den Entkoppler zustande, so daß weniger Protonen für die ATP-Synthese durch den  $CF_0CF_1$ -Komplex zur Verfügung stehen.

Die von Ansatz zwei zu vier ansteigende Elektronentransportrate ist ebenfalls auf die Wirkung des Entkopplers zurückzuführen. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Elektronentransport-Kette ist der Übergang der Elektronen aus dem PQ-Pool auf die  $Q_z$ -site des Cyt f des Cyt  $b_6f$ -Komplexes (vgl. Abb. 0.1, S. 1), bei dem ein Proton in das Thylakoidlumen abgegeben wird, der also pH-abhängig ist. Der Entkoppler fängt die Protonen im Thylakoidlumen weg, verringert dadurch die Konzentration der Protonen im Thylakoidlumen und beschleunigt so den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der  $e^-$ -Transportkette.

Für die Wirkung des Entkopplers vgl. Abb. 2.2, S. 7.

**Ansatz 5** Der Grund für Ansatz 5 war es, die Wirkung eines anderen Entkopplers vergleichend darzustellen. Die Substanz N-(3,4-Dichlorphenyl)-N',N'-dimethylharnstoff (DCMU), die hier zum Einsatz kam, hemmt spezifisch die  $Q_b$ -site des PS II, die das Plastochinon bindet. Daher legt die Hemmung die gesamte Elektronentransportkette lahm und der Elektronentransport kommt vollständig zum Erliegen. Dadurch kann das angeregte Elektron

<sup>4</sup>Dieser Maximalwert ist aus Abb. 0.1, S. 1 ersichtlich: Die Maximalzahl der gepumpten Protonen pro Zyklus beträgt 6, wenn man für n den Maximalwert von 2 einsetzt.

des P 680 nicht weitergeleitet werden, somit entsteht keine Elektronen-“Lücke” am P 680 und es wird kein Wasser gespalten. Durch den fehlenden Elektronentransport werden auch keine Protonen über die Membran transloziert, es kommt nicht zur Ausbildung eines pH-Gradienten und die ATP-Synthese kann ihrerseits nicht stattfinden.

Wie dargestellt, handelt es sich bei DCMU also um einen hocheffektiven Entkoppler, der die ATP-Synthese an der Thylakoidmembran vollständig zum Erliegen bringt.

**Ansatz 6** Der letzte Ansatz wurde nicht belichtet und diente als Korrektur für die ATP-Bestimmung über das Luciferin/Luciferase-System, da die Luciferase alles ATP, auch das im ADP eventuell vorhandene oder durch Adenylat-Kinase gebildete, erfaßt.



Abbildung 4.2: Reaktion der Adenylat-Kinase (Myokinase)

Durch die fehlende Belichtung kam es auch bei diesem Ansatz zu keinem Elektronentransport mit allen beim vorherigen Ansatz (5) beschriebenen Folgen.

Der Ansatz wäre bei der Verwendung von  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-PO}_4^{3-}$  nicht notwendig gewesen, da das  $^{32}\text{P}$  nur in dem durch den  $\text{CF}_0\text{CF}_1$ -Komplex gebildeten ATP zu finden wäre, weil  $\text{PO}_4^{3-}$  nur Substrat des  $\text{CF}_0\text{CF}_1$ -Komplexes, nicht jedoch der Myokinase (Adenylat-Kinase) ist.

## 5 Säure–Base–Phosphorylierung

### 5.1 Versuchsziel

Nachweis der ATP–Bildung an Thylakoiden im Dunkeln durch einen künstlich erzeugten pH–Gradienten (JAGENDORF und URIBE, 1966).

### 5.2 Durchführung

Für jeden Ansatz wurde gemäß Pipettierschema (Tab. 5.1) zuerst das Reaktionsgemisch in ein Eppendorf–Gefäß pipettiert, anschließend wurde das Säurebad in einem zweiten Gefäß gemischt. Die Zeitaufnahme begann mit dem Zusetzen von Succinat–KOH (Beginn der Ansäuerung).

Ansatz Nr.		1	2	3	4	5
Reaktions– gemisch	Tricin/ $P_i$	210	210	210	210	210
	MgCl <sub>2</sub>	50	50	50	50	50
	ADP	10	10	10	10	10
	NH <sub>4</sub> Cl				5	25
	Wasser	230	230	230	225	205
Säurebad	Thylakoide	100	100	100	100	100
	NH <sub>4</sub> Cl				5	25
	Wasser	25	25	25	20	
	Succinat–KOH	400	400		400	400
	Tricin–KOH			400		

Tabelle 5.1: Pipettierschema für die Versuchsansätze (alle Angaben in ml)

Der weitere Ablauf folgte der Versuchsbeschreibung, die mit TCA nach 1.5 min<sup>5</sup> abgestoppten Ansätze wurden bis zur ATP–Bestimmung (Versuchsbeschreibung, Anhang 2) auf Eis aufbewahrt.

Ansatz Nr.	1		2		3		4		5	
$E/\text{rel. LE}$	295	283	33	29	113	126	88	100	64	66

Tabelle 5.2: ATP–Messung

$V_{\text{ATP}}/\mu\text{l}$	5			10	15
$E/\text{rel. LE}$	212	216	(156) <sup>6</sup>	380	500

Tabelle 5.3: Eichgerade für die ATP–Messung

### 5.3 Berechnungen

**Stoffmenge an ATP** Die ATP–Bestimmung erfolgte im Luminometer gemäß Versuchsbeschreibung (Anhang 2). Zunächst wurde die Lichtemission (in relativen Lichteinheiten, rel. LE) für die einzelnen Proben des Versuches gemessen.

Für die Eichkurve wurden der Probe mit dem niedrigsten Wert der Lichtemission definierte Mengen einer durch 1:1000–Verdünnung hergestellten 0.1  $\mu\text{M}$  ATP–Lösung zugesetzt.

<sup>5</sup>bei Ansatz 2 war TCA von Anfang an im Reaktionsgemisch

<sup>6</sup>Die Lösung in der Küvette war falsch pipettiert, der Wert wurde daher bei der Regression nicht beachtet.

Von den erhaltenen Werten wurde der Extinktionswert des vorher vermessenen verwendeten Ansatzes abgezogen, das Ergebnis graphisch aufgetragen (Abb. 5.1) und über lineare Regression

$$y = ax + b \quad (5.1)$$

$$y = (a \pm u_a)x + (b \pm u_b)$$

eine Eichgerade rechnerisch bestimmt. Mit den Werten für  $a$ ,  $u_a$ ,  $b$  und  $u_b$  (Tab. 5.4) ergibt sich nach Gl. (5.1) für die Eichgerade:

$$y = (290 \pm 17)x + (73 \pm 19) \quad (5.2)$$

Nach Umstellung und Gleichsetzung

$$y = E$$

$$x = n_{\text{ATP,ali}}$$

ließen sich die ATP-Stoffmengen  $n_{\text{ATP,kuv}}$  (in pmol) der Versuche direkt errechnen:

$$n_{\text{ATP,kuv}} = \frac{E - 73}{290} \quad [n_{\text{ATP,kuv}}] = \text{pmol} \quad (5.3)$$

Die so erhaltenen Werte entsprechen der in der Küvette enthaltenen Stoffmenge ATP. Da bei diesem Versuch  $100 \mu\text{l}$  der verdünnten Probe zum Einsatz kamen, müssen die Werte noch auf die ATP-Menge  $n_{\text{ATP}}$  (in nmol!) im Versuchsansatz hochgerechnet werden:

$$n_{\text{ATP}} = \frac{100 \cdot 51.25 \cdot n_{\text{ATP,kuv}}}{1000} \quad [n_{\text{ATP}}] = \text{nmol} \quad (5.4)$$

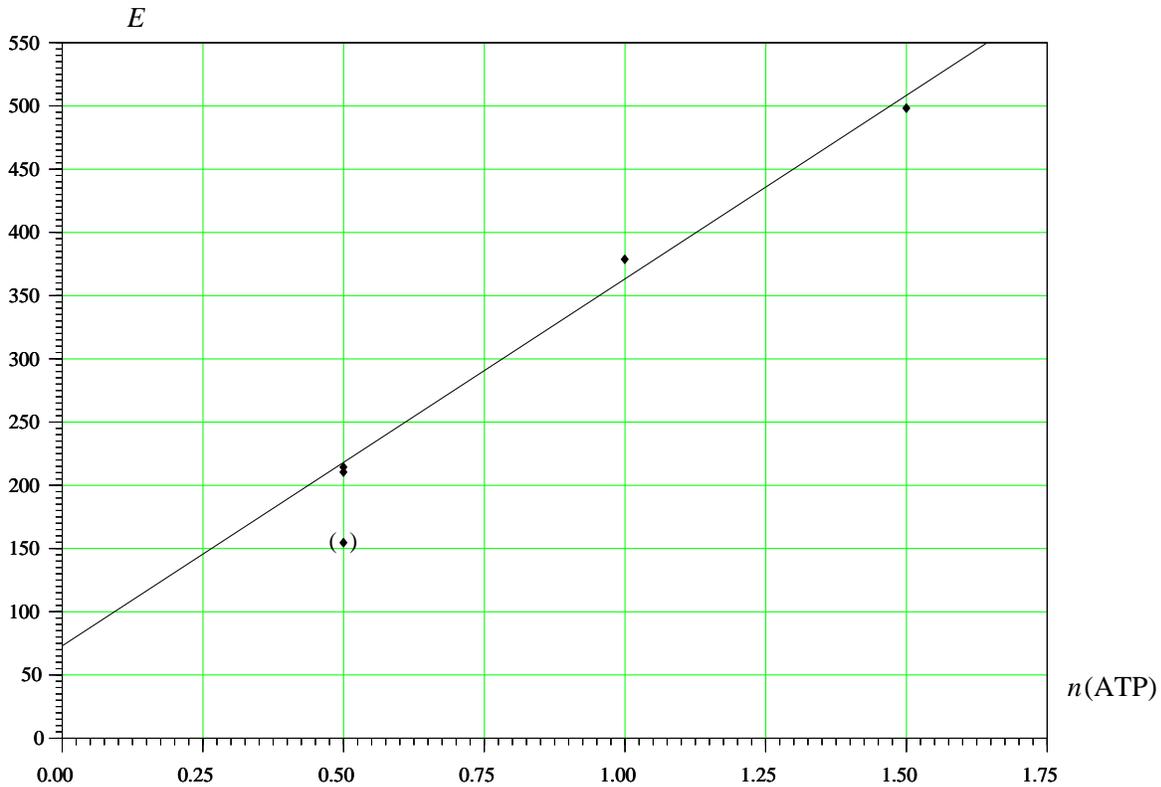


Abbildung 5.1: Eichkurve für Versuch 5:  $n(\text{ATP})$  in pmol,  $E$  in rel. Lichteinheiten

$a$	$u_a$	$b$	$u_b$
290	17	73	19

Tabelle 5.4: Lineare Regression für die ATP-Eichgerade

**ATP/CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>-Verhältnis** Für die Berechnung des ATP/CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>-Verhältnisses ist zunächst die Zahl der CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>-Moleküle zu berechnen. Dies ist möglich über das in der Versuchsanordnung angegebene Verhältnis

$$\frac{\text{CF}_0\text{CF}_1}{\text{Chlorophyll}} = \frac{1}{500} \quad (5.5)$$

und über das mittlere Molekulargewicht  $M_{\text{Chl}} = 900 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  von Chlorophyll a/b. Die Chlorophyllkonzentration der frisch hergestellten Thylakoid-Lösung betrug am Versuchstag

$$[\text{Chl}] = 0.97 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$$

Im Versuch wurden 100  $\mu\text{l}$  der Thylakoid-Lösung eingesetzt, was einer Masse

$$m_{\text{Chl,Ans}} = 97 \mu\text{g}$$

an Chlorophyll pro Ansatz entspricht. Daraus läßt sich die im Versuch eingesetzte Stoffmenge  $n_{\text{Chl,Ans}}$  errechnen:

$$n_{\text{Chl,Ans}} = \frac{m_{\text{Chl,Ans}}}{M_{\text{Chl}}} \quad (5.6)$$

Da aber auf jedes Molekül CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub> 500 Moleküle Chlorophyll kommen, ergibt sich die Zahl der CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>-Moleküle zu:

$$n_{\text{CF}_0\text{CF}_1,\text{Ans}} = \frac{n_{\text{Chl,Ans}}}{500} \quad (5.7)$$

Dieser Wert kann direkt zu den vorher errechneten Werten für die Stoffmenge an ATP ins Verhältnis gesetzt werden (vgl. Tab. 5.5).

Ansatz Nr.	1		2		3		4		5	
$E/\text{rel. LE}$	295	283	33	29	113	126	88	100	64	66
$n_{\text{ATP}}/\text{nmol}$	4.4	4.2	– <sup>7</sup>	– <sup>7</sup>	1.2	1.4	0.8	1.0	0.4	0.4
ATP/CF <sub>1</sub> CF <sub>0</sub>	20.6	19.6	–	–	5.6 <sup>8</sup>	6.7 <sup>8</sup>	3.6	4.6	1.6	1.8

Tabelle 5.5: Berechnung des ATP/CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>-Verhältnisses

## 5.4 Ergebnisse

Ansatz Nr.	1		2		3		4		5	
ATP/CF <sub>1</sub> CF <sub>0</sub>	20.6	19.6	–	–	– <sup>8</sup>	– <sup>8</sup>	3.6	4.6	1.6	1.8
ATP/CF <sub>1</sub> CF <sub>0</sub> <sup>9</sup>	14.4	13.4	–	–	–	–	–	–	–	–

Tabelle 5.6: Ergebnisse

<sup>7</sup>Wert unterhalb der Nachweisgrenze

<sup>8</sup>CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>-Komplex sollte inaktiv gewesen sein, da kein  $\Delta\text{pH}$  bestand.

<sup>9</sup>Werte nach Korrektur über die ATP-Menge in Ansatz 3; vgl. Diskussion

## 5.5 Diskussion

Der vorliegende Versuch stellt die Experimente von Jagendorf und Mitarbeitern (JAGENDORF und URIBE, 1966) nach. Die Ergebnisse lassen sich gut durch die chemiosmotische Hypothese von MITCHELL (1961) erklären, das Experiment gilt daher auch als eine ihrer ersten experimentellen Stützen.

Kerngedanke des Versuches ist, durch einen künstlich erzeugten pH-Gradienten über die Thylakoidmembran *im Dunkeln* ATP zu produzieren. Dadurch kann gezeigt werden, daß für die ATP-Produktion (neben den Substraten) ein pH-Gradient über der Membran notwendig ist. Das aber ist genau das, was MITCHELL als Mechanismus der Phosphorylierung an der Thylakoidmembran vorgeschlagen hatte.

**Ansatz 1** Im Ansatz 1 waren alle Bedingungen zur maximalen ATP-Produktion erfüllt ( $\Delta\text{pH}$ , intakte Enzyme, kein Entkoppler), die Werte für die ATP/CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>-Stöchiometrie sind daher auch die höchsten im Versuch.

**Ansatz 2** Im zweiten Ansatz wurde das TCA als Enzymhemmer (Abstoppen der Reaktion) dem Reaktionsgemisch gleich zugesetzt. Damit war jegliche enzymatische Reaktion von Anfang an unterbunden. Grund für diesen Ansatz war es, einen ATP-Nullwert zu erhalten, der dann als Korrekturterm in die Bestimmung der gebildeten ATP-Mengen der anderen Ansätze eingehen kann. Er hat im vorliegenden Versuch aber keinen Effekt, da die ATP-Menge unterhalb der Nachweisgrenze lag.

**Ansatz 3** Bei Ansatz 3 wurde statt Succinat-KOH (pH 4.9) 30 mM Tricin-KOH (pH 8.8) verwendet, d. h. es existierte kein künstlicher pH-Gradient. Dieser Ansatz sollte das durch andere Enzyme gebildete ATP nachweisen. Das Problem der Auswertung dabei ist, daß im vorliegenden Versuch die ATP-Mengen für die Ansätze vier und fünf deutlich unter der in diesem Ansatz gebildeten Menge an ATP liegen. Führt man die ATP-Menge aus Ansatz 3 als Korrekturterm in die Rechnung ein, ergibt sich demnach für die Ansätze 4+5 kein ATP/CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>-Verhältnis (vgl. Tab. 5.6, 2. Zeile).

**Ansatz 4+5** Die beiden letzten Ansätze sind durch eine steigende Entkopplerkonzentration charakterisiert, der zu einer zahlenmäßig geringeren ATP/CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>-Stöchiometrie führt. Da der Entkoppler (NH<sub>4</sub>Cl) im Inneren der Thylakoide Protonen wegfängt — darauf und auf der Freisetzung von Protonen im Stroma infolge des Protolysegleichgewichtes des NH<sub>4</sub>Cl beruht die entkoppelnde Wirkung —, stehen weniger Protonen als Substrat des CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>-Komplexes und damit zur ATP-Synthese zur Verfügung.

## 6 Quantitative Bestimmung von Photosystem I (P700)

### 6.1 Versuchsziel

Bestimmung der Größe der Lichtantennen (LHCs<sup>10</sup>) der Photosysteme über die quantitative Messung von Photosystem I (P700).

### 6.2 Durchführung

P700 (PS I) wird über ein Redox-Differenzspektrum an einem Zweistrahl-Photometer quantitativ bestimmt. Die chemische Oxidation erfolgt dabei durch Ferricyanid, die Reduktion über Zugabe einer geringen Menge (kristallinen) Na-Ascorbates direkt in die Küvette.

**Ansatz:** 180  $\mu\text{l}$  der Thylakoide werden wie in der Versuchsbeschreibung angegeben in 3 ml Puffer inkubiert (Auflösung der Membranstruktur mit Triton X-100) und vor der Überführung in die Küvette mit 30  $\mu\text{l}$  Ferricyanid versetzt (Oxidation des P700).

**Messung:** Handhabung des Spektrometers und Meßwertaufnahme erfolgen wie in der Versuchsbeschreibung angegeben. Die Messung erfolgt als Doppelbestimmung, wobei das Na-Ascorbat einmal der Meß- und einmal der Referenzküvette zugesetzt wird (Reduktion des P700).

### 6.3 Berechnungen

**Bestimmung der Konzentration von P700 in der Küvette** Die molare Konzentration des P700 in der Küvette errechnet sich aus der gemessenen Extinktion  $E$  über das LAMBERT-BEERSches Gesetz

$$c = \frac{E}{\varepsilon \cdot d} \quad (6.1)$$

bei gegebener Schichtdicke  $d = 1 \text{ cm}$  und dem Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$

$$\varepsilon_{\text{mM}, 1 \text{ cm}, \approx 700 \text{ nm}} = 64 \quad (6.2)$$

für mM Konzentrationen, die gegebene Schichtdicke und einer Wellenlänge von  $\approx 700 \text{ nm}$  zu

$$c_{\text{P700}} = \frac{0.015}{64 \cdot 1} \quad (6.3)$$

$$\begin{aligned} c_{\text{P700}} &= 0.000234 \text{ mM} \\ &= 0.234 \mu\text{M} \end{aligned} \quad (6.4)$$

**Bestimmung des Chlorophyll-Gehaltes in der Lösung** Ausgehend von einer Massenkonzentration  $c_{\text{m,Chl}}$  für Chlorophyll von

$$c_{\text{m,Chl}} = 60 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \quad (6.5)$$

und einem mittleren Molekulargewicht  $M_{\text{Chl}}$  von Chlorophyll

$$M_{\text{Chl}} = 900 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \quad (6.6)$$

kann der Chlorophyllgehalt (Stoffmengenkonzentration) der Lösung bestimmt werden:

$$c_{\text{Chl}} = \frac{60 \cdot 1000}{900} \quad (6.7)$$

$$c_{\text{Chl}} = 66 \mu\text{M} \quad (6.8)$$

---

<sup>10</sup>LHC = light harvesting complex

**Verhältnis Chlorophyll/P700** Durch Einsetzen von Gl. (6.4) und (6.8) in (6.9) erhält man als Verhältnis der Chlorophyllmoleküle zu P700 (PS I):

$$\frac{\text{Chl}}{\text{P700}} = \frac{c_{\text{Chl}}}{c_{\text{P700}}} = \frac{66 \mu\text{M}}{0.234 \mu\text{M}} = 282 \quad (6.9)$$

#### 6.4 Ergebnis

Das Verhältnis von Chlorophyll zu P700 beträgt ca. 300:1, die Wellenlänge  $\lambda_{\text{max}}$  der maximalen Absorption ca. 700 nm.

#### 6.5 Diskussion

Nimmt man ein Verhältnis der Photosysteme zueinander von 1:1 an, enthielten rein rechnerisch die Lichtantennen (LHCs) der beiden Photosysteme PS I (P700) und PS II (P680) jeweils etwa 150 Moleküle Chlorophyll.

Während für die LHC I des PS I nur spärlich konkrete Werte in der Literatur zu finden sind — DEY und HARBORNE (1997) erwähnen einen Wert von ca. 100 Molekülen Chlorophyll —, schwankt die Größe des LHC II des PS II bei höheren Pflanzen über einen weiten Bereich. Ebenfalls bei DEY und HARBORNE (1997) findet sich ein Wert für die Größe des LHC II von ca. 250 Molekülen Chlorophyll, RICHTER (1996) erwähnt 150 Moleküle Chlorophyll für den LHC II des Spinates.

Wenn man für den LHC I ca. 100 Moleküle Chlorophyll annimmt, entfielen bei einem ermittelten Wert von ca. 300 Molekülen Chlorophyll für LHC I und II im obigen Versuch noch ca. 200 Chlorophyll-Moleküle auf das LHC II. Allerdings ist die statistische Sicherheit der Bestimmung nicht ausreichend, um aus den erhaltenen Ergebnissen Schlüsse zu ziehen.

Mögliche Fehler könnten beim Pipettieren des Ansatzes bzw. bei der Messung selbst liegen, da in der Lösung nach Zugabe von Ferricyanid ein Ausfällen zu beobachten war. Die Ausgangs-Konzentration des Chlorophylls sollte dagegen hinreichend genau gewesen sein, da sie photometrisch bestimmt wurde.

## Literatur

- DEY, P. M. und J. B. HARBORNE, Hg. (1997): *Plant Biochemistry* (Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto)
- HÄDER, D.-P., Hg. (1999): *Photosynthese* (Thieme, Stuttgart)
- HERDER VERL., Hg. (1983ff.): *Lexikon der Biologie* (Herder und Spektrum Akad. Verl., Freiburg und Heidelberg)
- JAGENDORF, A. T. und E. URIBE, *ATP formation caused by acid–base transition of spinach chloroplast*. In: *Proc Natl Acad Sci USA*, Bd. 55:(1966), S. 170–177
- MITCHELL, P., *Coupling of photophosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism*. In: *Nature*, Bd. 191:(1961), S. 144–148
- NULTSCH, W. (1991): *Allgemeine Botanik* (Thieme, Stuttgart), 9. Aufl.
- RICHTER, G. (1996): *Biochemie der Pflanzen* (Thieme, Stuttgart)
- SITTE, P.; H. ZIEGLER; F. EHRENDORFER und A. BRESINSKY, Hg. (1998): *Strasburger. Lehrbuch der Botanik* (Fischer, Stuttgart Jena), 34. Aufl.
- VOET, D. und J. G. VOET (1995): *Biochemistry* (Wiley & Sons, New York, etc.), 2. Aufl.

## Anhang: Meßprotokolle