

Facharbeit

**Thema der Arbeit:
Stressreaktion von Keimlingen am Beispiel der Skoto- und
Photomorphogenese**

Verfasser: Lorenz Bokemeyer

Klasse: Biologie Leistungskurs (Bi L)

Betreuende Lehrkraft: Dr. F. Schaller

Abgabetermin: 6.12.2015

1	Einleitung	3
2	Material	4
3	Methoden	5
3.1	Anzucht der Keimlinge	5
3.2	Abwiegen von Frisch- und Trockengewicht	5
3.3	Extrahieren von Pigmenten aus den Keimlingen.....	5
3.3.1	Dünnschichtchromatographie.....	6
3.3.2	Rf-Wert-Bestimmung (Wanderungsstrecke der Proteine)	7
3.4	Elution und Messung der Absorptionsspektren der mittels DC aufgetrennter Farbpigmente.....	7
3.5	Bestimmung des Chlorophyllgehaltes von Keimlingen.....	8
3.6	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	8
3.6.1	Herstellung des Laufpuffers für die Gelelektrophorese	10
3.6.2	Herstellung der Polyacrylamidgele	10
4	Ergebnisse	10
4.1	Vergleich des Wachstums sowie des Frisch- und Trockengewichts der unter Licht und unter Lichtausschluss gewachsenen Keimlinge	10
4.2	Nachweis von Pigmenten in belichteten und etiolierten Keimlingen	12
4.3	Spektralanalyse der Farbpigmente unter Licht gewachsener Keimlinge.....	13
4.4	Chlorophyllgehaltsbestimmung	14
4.5	Proteinanalyse mittels SDS-Polyacrylamide-Gelelektrophorese.....	14
5	Diskussion	16
6	Zusammenfassung	21
7	Quellenverzeichnis	22
8	Selbständigkeitserklärung	23
Anhang:	Ausgearbeitete Praktikumsvorschrift für Schülerinnen und Schüler der Qualifikationsphase	

1 Einleitung

Pflanzen besitzen die Fähigkeit auf Veränderungen ihrer Umgebung zu reagieren. Je nach Art und Ausmaß können durch Änderungen des Umfeldes Stresssituationen entstehen, welche häufig eine Anpassung der Pflanze hervorrufen. Bei solchen Adaptationen verändern Pflanzen ihre Optimalbedingungen so, dass sie die Auswirkungen des Stresses reduzieren können. Selbst unter extremen Bedingungen können Pflanzen häufig durch ein breites Spektrum an Stress mindernden Mechanismen zumindest überleben (www.spektrum.de).

Stress kann bei Pflanzen durch äußere, abiotische oder biotische Faktoren hervorgerufen werden. Dieser Anspannungszustand führt zu einer vorübergehenden oder andauernden Veränderung des Stoffwechsels, so dass die Entwicklung der Pflanze, die sogenannte Morphogenese, verändert wird (www.spektrum.de). Ein möglicher Stress-auslösender Faktor ist das Licht, welcher in dieser Facharbeit genauer untersucht wird.

Grüne Pflanzen sind als Photosynthese betreibende Organismen elementar auf Licht angewiesen. Um die optimale Ausnutzung der zur Verfügung stehenden Lichteinwirkung zu gewährleisten, haben Pflanzen in der Evolution auf molekularer und genetischer Ebene diverse Regelmechanismen entwickelt. Bei der sogenannten Photomorphogenese wächst die Pflanze unter Lichteinfluss, hierbei werden z.B. für die Photosynthese elementare Stoffe wie das Chlorophyll synthetisiert. Eine Entwicklung ohne Licht wird Skotomorphogenese genannt, eine Produktion von Chlorophyll findet dann kaum statt. Pflanzen geraten ohne Licht, ohne Chlorophyll und damit ohne Photosynthese in eine Stresssituation. Sie reagieren auf diese Stresssituation mit einem als Etiolement bezeichnetem Wachstumsverhalten.

In der folgenden Facharbeit wurden die Unterschiede des pflanzlichen Stoffwechsels bei Skoto- bzw. Photomorphogenese untersucht. Darüber hinaus wurde in diesem Rahmen eine bestehende Versuchsvorschrift im Fach Biologie zu dem Thema "Etiolement-Chromatographie-Spektren" überarbeitet. Die Versuche der Arbeit beruhen auf Untersuchungen an belichteten und etiolierten (ohne Licht gekeimten) Sonnenblumen- und Erbsenkeimlingen. Dabei wurde untersucht, inwiefern sich das Wachstum, die Synthese von Farbpigmenten und die Proteinexpression unter Lichtausschluss verändern. Die in den Keimlingen enthaltenen Proteine wurden untersucht, da Unterschiede der Gen-Expressionen die Grundlage für beobachtete phänotypischen Veränderungen sein können.

Abgesehen von dem generellen Interesse an diesem Thema, hatte ich durch die Praktikumsteilnahme die Möglichkeit Versuche durchzuführen, zu denen ich sonst kein Zugang gehabt hätte. Desweiteren hat mich gereizt, dass meine Arbeiten in der Erstellung bzw. Fertigstellung einer Praktikumsvorschrift für Biologiekurse münden, an deren Betreuung ich als Experte dann teilnehmen kann.

2 Material

Sonnenblumensaat: Raiffeisen Tierfreund Sonnenblumenkerne

Vermiculit, Korngröße Nr.2-6, Deutsche Vermiculite Dämmstoff GmbH

Chemikalien:

- Calciumcarbonat (CaCO_3), Riedel-de Haen GmbH
- Seesand, Riedel-de Haen GmbH
- Aceton, Carl Roth GmbH + Co.KG
- Benzin, Carl Roth GmbH + Co.KG
- 10%ige Natriumchlorid-Lösung (NaCl: Carl Roth GmbH + Co.KG)
- wasserfreies Natriumsulfat (getrocknet), Merck
- destilliertes Wasser
- Tris-Hydrochlorid, Carl Roth GmbH + Co.KG
- Roti-Load 1 4-Fach konzentriert, Carl Roth GmbH
- Ascorbinsäure, Merck
- n-Hexan, Carl Roth GmbH
- Diethylether, Carl Roth GmbH
- Ethanol, Carl Roth GmbH

Wichtigste Geräte:

- Zentrifuge, PEQLab Perfectspin Mini
- Photometer, Hach Lange DR2800
- DC-Chromatographie Trennkammer, Desaga, Heidelberg
- Gelelektrophoreseapparatur, Werkstätten der Ruhr-Universität Bo

3 Methoden

Die folgenden Methoden wurden teilweise aus der Facharbeit von Ariane Schmücker übernommen.

3.1 Anzucht der Keimlinge

Die aufgeführten Versuche beziehen sich auf zwischen 1 und 13 Tage alte Sonnenblumenkeimlinge, wovon je einer etiiert und einer belichtet ist. Die belichteten Keimlinge werden auf der Fensterbank, die etiierten ohne Licht, bei ca. 20-25°C Raumtemperatur angezogen und mäßig feucht gehalten.

3.2 Abwiegen von Frisch- und Trockengewicht

Zum Abwiegen des Frischgewichtes werden für jedes Alter (1 bis 13 Tage) je fünf Keimlinge von den belichteten und etiierten Pflanzen aus den Anzuchtsschalen entnommen. Nun wird das Frischgewicht gewogen und durch die Anzahl der Keimlinge dividiert. So erhält man das Durchschnittsgewicht der belichteten und etiierten Pflanzen von jedem Alter. Bei den jungen Pflanzen, die nur aus Samen bestehen, werden 10 Samen entnommen, um das Ergebnis eindeutiger zu machen.

Um das Trockengewicht zu ermitteln, werden die Keimlinge für drei Tagen bei ca. 90°C im Ofen getrocknet, sodass das komplette Wasser verdunstet. Daraufhin wird das Trockengewicht der Pflanzen gewogen und mit dem Frischgewicht verglichen.

3.3 Extrahieren von Pigmenten aus den Keimlingen

Von den belichteten und etiierten Pflanzen (10 Tage alt) werden je 5g Pflanzenmaterial abgewogen. Hierbei werden sowohl Stiele als auch die Keimblätter etwa im gleichen Maße verwendet.

Die Proben werden nacheinander mit Seesand, einer Spatelspitze Calciumcarbonat, 50ml Aceton und 5ml Benzin in einem Mörser zerrieben, wobei Benzin und Aceton erst nach und nach hinzu gegeben werden. Die breiartige Masse wird anschließend in einer Nutsche filtriert. Die Nutsche ist ein offener Filter, ähnlich einem Kaffeefilter, dessen flacher, gelochter Boden mit einem Filterpapier abgedeckt ist. Sie dient dazu, die Flüssigkeit von ihren festen Bestandteilen, wie z.B. dem Seesand, zu trennen. Hierzu wird mit einer Wasserstrahlpumpe Unterdruck erzeugt (Saugflasche), der die flüssigen Bestandteile der Probe durch das Filterpapier saugt. Die gesuchten Pflanzenfarbstoffe (Pigmente) liegen zusammen mit weiteren Bestandteilen in dem Filtrat vor. Um die Pigmente abscheiden zu können, wird das Filtrat in einen Scheidetrichter überführt und dort mit 50ml einer 10%igen Natriumchlorid-Lösung und 30ml Benzin versetzt. Durch

Schwenken des Trichters gehen die Pflanzenfarbstoffe (Pigmente) in die obere Benzinphase über.

Die untere Wasser-Aceton-Phase wird danach abgelassen. Anschließend wird das Filtrat 2-3 mal mit je 30ml destilliertem Wasser versetzt. Der Scheidetrichter wird wieder geschwenkt und die untere Wasserphase entfernt. Die Benzinphase wird in einen Erlenmeyerkolben überführt und dort durch Zugabe einiger Spatelspitzen wasserfreien Natriumsulfats von Resten der Wasserphase getrennt. Nun wird die vollständig wasserfreie Phase ohne das Natriumsulfat in ein Becherglas gefüllt. Das Becherglas wird einige Zeit stehen gelassen, bis sich das Substrat durch spontane Verdunstung auf 0,5ml eingeeengt hat.

3.3.1 Dünnschichtchromatographie

Um die extrahierten Proben in ihre einzelnen Bestandteile zu trennen, wird die Dünnschichtchromatographie (DC) verwendet. Hierbei werden die Pigmente auf dünne, quadratische Platten aus Aluminium, die mit einem feinporigen Trägermaterial aus Kieselgel beschichtet sind, mit Kapillaren aufgetragen. Die Platten werden ca. eine Stunde in der DC-Kammer gelassen, bis die Laufmittelfront fast die obere Kante erreicht hat. Nach dem Herausnehmen wird die Laufmittelfront sofort gekennzeichnet, da sie sehr schnell durch Verdunsten des restlichen Laufmittels auf der Platte unsichtbar wird. Die Position der Front wird später für die Auswertung der Retentionsfaktoren (Rf-Werte) benötigt.

Vor Beginn der Versuche werden die DC-Platten in Ascorbinsäure, welche als Oxidationsschutz dient, eingelegt und ca. 1h bei 60°C im Trockenschrank getrocknet. Nach diesem Vorgang wird 2cm von der unteren Kante der Platte entfernt eine Startlinie gezogen und die zuvor eingeengte Benzinphase mit den Farbstoffen aufgetragen. Hierbei wird ein Abstand von 1cm zu jeder Seite freigelassen. Die fertigen Platten werden senkrecht in eine luftdicht verschlossene Laufmittelkammer gestellt, in der sich 50ml eines Laufmittels, bestehend aus 100ml Benzin, 11ml Isopropanol und 5 Tropfen A. dest., befinden, wobei sie bis zur Startlinie, auf der sich die Pigmente befinden, im Laufmittel stehen.

Durch den Kapillareffekt wandert das Lösungsmittel an der DC-Platte nach oben und nimmt dabei die Probe mit. Je nachdem wie stark die zu trennenden Stoffe mit dem Trägermaterial wechselwirken, werden sie unterschiedlich stark adsorbiert. Je stärker die Wechselwirkungen, desto langsamer wandert der Stoff nach oben.

Nach dem Trocknen werden die Rf-Werte für die verschiedenen vorhandenen Pigmente ausgerechnet. Anhand der Rf-Werte können die Pigmente durch Vergleich mit Literaturdaten identifiziert werden. Hier geschieht dies durch vergleichen der

Banden mit einer schematischen Darstellung der verschiedenen Banden aus einer Chromatographie der Grünalge. Es sollten zwei Chlorophylle, eine Lutein und eine Carotinbande (alpha und beta Carotine) neben weiteren Pigmenten vorhanden sein.

3.3.2 Rf-Wert-Bestimmung (Wanderungstrecke der Proteine)

Um den Rf- Wert eines Pigments zu berechnen, wird die Strecke, die dieses von der Startlinie aus zurückgelegt hat, durch die der Laufmittelfront (Strecke des Laufmittels von der Startlinie aus) dividiert. Die so errechneten Werte sind daher für ein spezielles Pigment unabhängig von der Laufstrecke (DC-Größe) immer identisch.

3.4 Elution und Messung der Absorptionsspektren der mittels DC aufgetrennter Farbpigmente

Die Farbstoffe werden jeweils mit einem Spatel von der Aluminiumschicht der DC-Platte gekratzt und mit einem Stück Alufolie aufgefangen. Zur Aufbewahrung für spätere Versuche werden sie in ein 2,2ml Eppendorf-Gefäß gefüllt.

Um die Farbstoffe vom Kieselgel zu lösen, wird dieses, je nach den Pigmenten die es trägt, mit unterschiedlichen Stoffen eluiert. Für die Banden beider Chlorophylle verwendet man Diethylether, für die Luteinbande Ethanol und für die der Carotine wird n-Hexan benutzt.

Wird für einen Stoff ein anderes Lösungsmittel verwendet, kann dies seine Absorptionseigenschaft und somit die Ergebnisse des Versuchs beeinträchtigen.

Je 2ml der entsprechenden Lösungsmittel werden in die Eppis gegeben, in denen das Kieselgel aufbewahrt wurde. Nach kurzem Schütteln geht die Färbung vom Gel in das Lösungsmittel über. Das entfärbte Kieselgel wird anschließend abzentrifugiert. Um die Extinktionsspektren der einzelnen Pigmente bestimmen zu können, werden diese nun im Photometer in 3ml Küvetten aus optischem Glas untersucht.

Ein Photometer ist ein Gerät, das einen Lichtstrahl einer bestimmten Wellenlänge durch die Probe wirft und misst, wie stark dieser absorbiert wurde. Hierzu muss zuerst mit einer Küvette, in der nur das entsprechende Lösungsmittel enthalten ist, der Nullwert bestimmt werden, da sowohl das Lösungsmittel als auch die Küvette selbst Licht absorbieren und sich dieser Wert auf die Extinktion durch das Pigment addieren würde. Das Ergebnis würde also ohne diesen Nullabgleich verfälscht werden.

Bei den Chlorophyllen wird die Absorption bei einer Wellenlänge von 400 bis 700nm bzw. bei Lutein und Carotin nur ein Bereich von 390 bis 550nm (siehe Anhang Praktikumsvorschrift) untersucht. Die Spektren werden in 5nm bis 10nm-Schritten

abgegangen. Die Extinktion dieser Wellenlängenbereiche durch die unterschiedlichen Pigmente wird in eine Tabelle eingetragen und später in Diagrammform dargestellt.

3.5 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes von Keimlingen

Ein belichteter und ein unbelichteter Keimling sind mit je 40ml 80%igem Aceton und etwas Seesand in einem Mörser zerstoßen. Der entstehende Brei wird anschließend direkt in eine 3ml Küvette filtriert und im Photometer bei den Wellenlängen 652nm analysiert. Bei dieser Wellenlänge haben die Absorptionskurven der beiden Chlorophylle einen Hochpunkt, beide absorbieren bei dieser Wellenlängen das Licht also sehr stark. Mit Hilfe der Ergebnisse des Photometers lässt sich nun der Chlorophyllgehalt pro ml Lösung berechnen (siehe Praktikumsvorschrift). Bei einer Wellenlänge von 652nm lautet diese Gleichung:

$$E_{652} \cdot 0,725 = \frac{mgChlorophyll}{mlLösung}$$

3.6 SDS-Polyacylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) ist ein Verfahren, bei dem die in einer Probe enthaltenen Polypeptide (Proteine) nach Denaturieren auf ihre Primärstruktur (Aminosäureketten) der Größe nach aufgetrennt werden. Zur Gewinnung der Proben werden jeweils 5g Material von belichteten und etiolierten Keimlinge oberhalb der Wurzel mit Wasser und Seesand per Mörsern zerrieben. Anschließend wird 1ml dieses Proteingemisches bei 1.600g zehn Minuten lang zentrifugiert. Der entstandene Überstand (flüssige Phase nach Zentrifugation) wird nun wieder in Eppis überführt und bei der maximal Geschwindigkeit 15 Minuten lang zentrifugiert. Nun sind zwei Gruppen von Proteinen aufzufinden. Das Sediment (Bodensatz am Boden des Eppis) umfasst die unlöslichen Proteine und wird durch Reibung erneut in Wasser aufgelöst. Der Überstand enthält die löslichen Proteine. Danach werden 120µl der Probe mit ebenfalls 40µl des Probenpuffers in Eppendorfgefäßen gemischt.

Diese werden anschließend in einem Heizblock für 20 min auf 100°C erhitzt. Danach werden jeweils 20µl der löslichen und unlöslichen Proteine belichteter bzw. etiolierter Pflanzen in die Taschen des Gels pipettiert.

In die erste Tasche wird ein Proteinstandard zur Bestimmung der Größe der Polypeptide der Proben gegeben. Anschließend werden die Proteinproben in ein senkrecht, zwischen zwei Glasplatten stehendes Gel, welches an seinem oberen Ende kleine Einbuchtungen (Taschen) für die Proben besitzt (siehe Abb.1), pipettiert. Der obere Teil wird als Sammelgel bezeichnet. Von dort aus laufen die Proben bis zur

Grenze des darunterliegenden Trenngels, welches die einzelnen Polypeptide der Größe nach auftrennt. Dieses Auftrennen geschieht durch einen Stromfluss infolge einer an die gegenüberliegenden Seiten des Gels angelegten Spannung. Die durch das SDS-Detergenz negativ aufgeladenen Proteine wandern nach unten zum dort angebrachten Pluspol, wobei die kürzeren Aminosäureketten schneller als die größeren durch das Trenngel wandern. Nachdem die Gele eingefärbt wurden, um die Proteine sichtbar zu machen, erscheinen diese als Striche (Banden) auf dem sonst farblosen Gel.

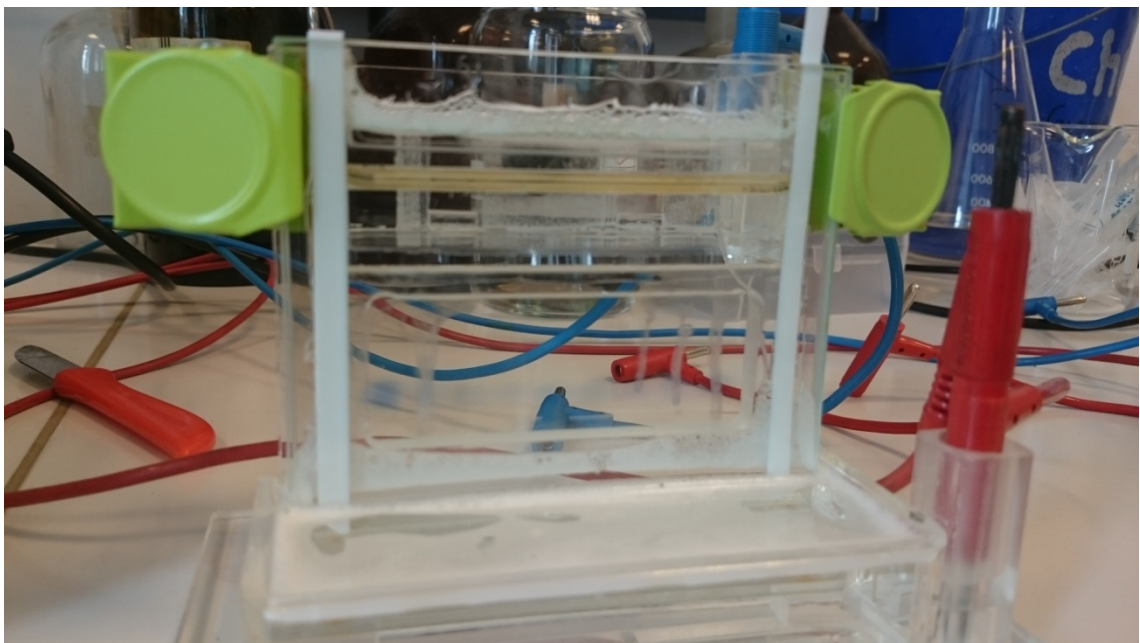


Abbildung1: Apparatur zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Abbildung 1 zeigt das Gel, welches sich zwischen den senkrechten Glasplatten befindet. Zum Zeitpunkt der Aufnahme des Fotos waren die Proben bereits in die Taschen des Gels pipettiert und unter Spannung gesetzt, so dass die Proben bereits in das Trenngel gelaufen sind. Sie sind durch eine leichte Blaufärbung im unteren Teil zu erkennen.

3.6.1 Herstellung des Laufpuffers für die Gelelektrophorese

Zur Erstellung des Laufpuffers (0,2 M Glycin, 0,025M Tris, 0,1% SDS) wurde 15g Glycin, 3,94g Tris und 10mL 10% SDS zusammengerührt und auf 1 Liter mit Wasser aufgefüllt. Danach wurde der pH auf 8.6 eingestellt.

Der Puffer wird bei dem Gelelektrophoreseapparat in ein Becken ober- und unterhalb des Gels gefüllt, um ein stabiles und konstantes elektrisches Feld zu erstellen.

3.6.2 Herstellung der Polyacrylamidgele

Das Trenngel besitzt eine geringere Porenweite, eine höhere Salzkonzentration sowie einen höheren pH-Wert im Vergleich zum Sammelgel. Beim Einwandern der Proben in das Trenngel tritt eine weitere Verschärfung der Zone ein. Die großen Proteine werden an dieser „Gelgrenze“ zunächst zurückgehalten, sodass die Glycinionen passieren können. Im Puffersystem des Trenngels löst sich dann der Proteinstapel auf und die Proteine werden nach ihrer molekularen Größe getrennt. In Tabelle 1 sind die Bestandteile der Gele wiedergegeben.

Lösungen	Trenngel	Sammelgel
Wasser	3,15mL	4,55mL
Trenngelpuffer	2,5mL	- - -
Sammelgelpuffer	- - -	1,88mL
Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%)	4,16mL	1,0mL
SDS (10%)	100µL	75µL
Ammoniumperoxidsulfat (10%)	75µ	40µL
TEMED	7,5µL	25µL
Summe	10mL	7,5mL

Tabelle 1: Bestandteile der Trenn- und Sammelgele.

4 Ergebnisse

4.1 Vergleich des Wachstums sowie des Frisch- und Trockengewichts der unter Licht und Lichtausschluss gewachsenen Keimlinge

Das Wachstum von etiolierten und unter Licht gekeimten Sonnenblumenkeimlingen wurde über einen Zeitraum von 12 Tagen beobachtet. Hierbei zeigen sich deutliche Unterschiede in der Entwicklung. Exemplarisch sind in Abbildung 2 neun Tage alte Keimlinge gezeigt. Die unter Licht gekeimten Pflanzen sind im Vergleich zu den etiolierten klein, dafür aber stämmiger und robuster. Die nach Licht suchenden, etiolierten Keimlinge sind deutlich höher gewachsen und fallen durch ihre Farblosigkeit auf.

Um zu untersuchen, ob die Unterschiede im Wachstum auf Veränderung des wasserfreien Materials beruhen, wurde sowohl das Frischgewicht wie auch das Trockengewicht der Keimlinge gemessen. In Abbildung 3 ist zu erkennen, dass das Frischgewicht sowohl der unter Licht gekeimten als auch der etiolierten Pflanzen mit dem Alter steigt. Die unter Licht gekeimten Pflanzen werden jedoch schwerer als die etiolierten. Nach 12 Tagen wiegt ein Keimling, der unter Lichteinflüssen gekeimt ist,

durchschnittlich 1,118g, während der etiolierte Keimlinge durchschnittlich nur 0,586 g wiegt.

Im Gegensatz zum Frischgewicht verändert sich das Trockengewicht nicht mit dem Alter der Pflanze über den Beobachtungszeitraum, dies gilt für etioliert wie auch nicht etioliert Pflanzen. Das Gewicht liegt unter beiden Bedingungen konstant bei etwa 0,06g (Abb.3).



Abbildung 2: Links etiolierte und rechts beleuchtete 9 Tage alte Sonnenblumenkeimlinge

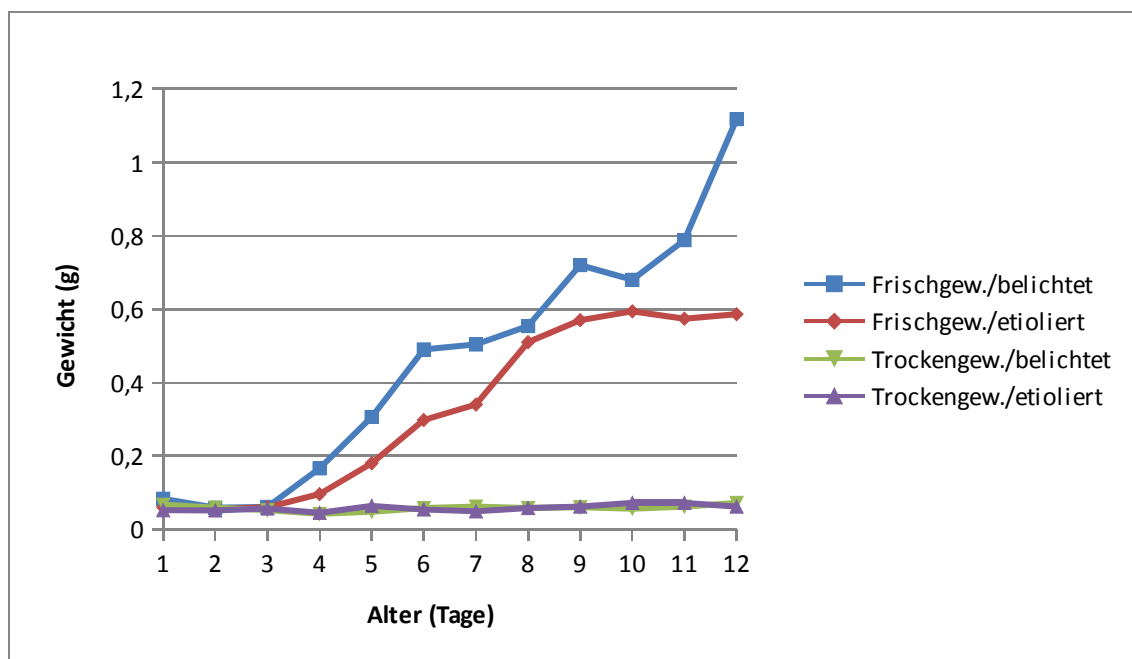


Abbildung 3: Veränderung von Frisch- und Trockengewicht in einem Zeitraum von 12 Tagen von belichteten und etiolierten Pflanzen.

4.2 Nachweis von Pigmenten in belichteten und etiolierten Keimlingen

Die Bedeutung des Lichteinflusses auf die Synthese von Farbpigmenten, am Beispiel von Erbsenkeimlingen, wurde mittels einer Dünnschichtchromatographie (DC) untersucht.

Auf der in Abbildung 4 gezeigten DC-Platte ist zu erkennen, wie sich die Pflanzenpigmente in Form von Banden aufgetrennt haben. Auf der linken Seite sind die Banden der belichteten Pflanzen zu erkennen und auf der rechten Seite, die der etiolierten. Da die Pigmente in den etiolierten Pflanzen nur wenig konzentriert vorhanden sind, stellen sich keine eindeutigen Banden dar. Die Banden der belichteten Pflanze sind im Gegensatz dazu sehr eindeutig und genau zu erkennen (Abb 4, linke Seite). Mit Hilfe des Vergleichen von publizierten Mitteln lässt sich anhand der zurückgelegten Strecke der Banden mittels Berechnung der Rf-Werte auf die in den Banden enthaltenen Farbpigmente schließen (siehe Abb. 4).

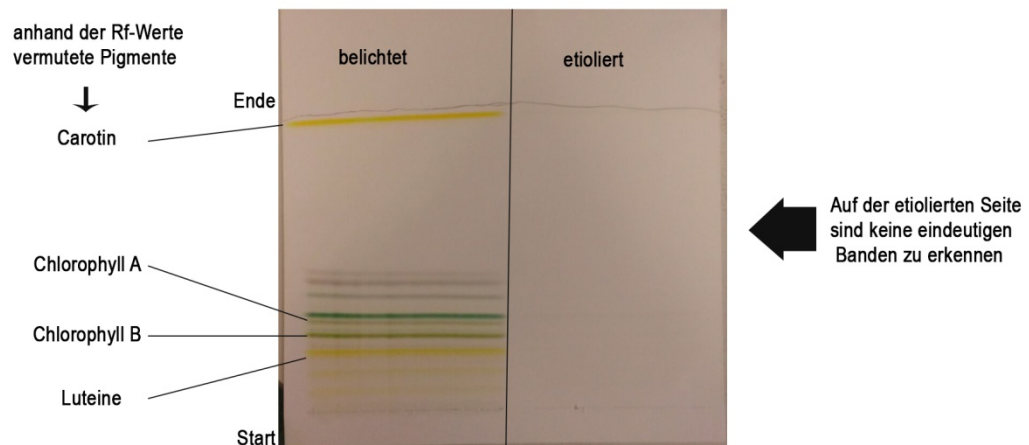


Abbildung 4: Dünnschichtchromatographie. Linke Seite: Farbpigmente der belichteten Pflanze. Rechte Seite: Farbpigmente der unbelichteten Pflanze

4.3 Spektrenanalyse der Farbpigmente unter Licht gewachsener Keimlinge

Zur Bestätigung der Schlussfolgerung bezüglich der anhand der Rf-Werte vermuteten Farbpigmente, wie oben beschrieben, wurde eine Spektralanalyse der von der DC-Platte entnommenen Stoffe durchgeführt. Anhand eines Vergleiches der Absorptionsmaxima dieser Spektralanalyse mit Literaturangaben sollten die vermuteten Farbpigmente eindeutig identifiziert werden.

Die Untersuchungen der Extinktionen der verschiedenen vermuteten Farbpigmente sind in Abbildung 5 wiedergegeben, es zeigen sich die verschiedenen Maxima der Lichtabsorbierung der vermuteten Farbpigmente. Die beiden vermuteten Chlorophylle besitzen jeweils zwei Hochpunkte, wobei Carotin und Lutein nur einen zeigen. Bei ungefähr 450 Nanometern weisen alle Graphen einen Hochpunkt, auf bei dieser Wellenlänge wurde also besonders viel Licht absorbiert. Chlorophyll A und B haben beide einen zweiten deutlichen Hochpunkt bei 645 nm. Allerdings absorbiert Chlorophyll B mehr Licht als Chlorophyll A.

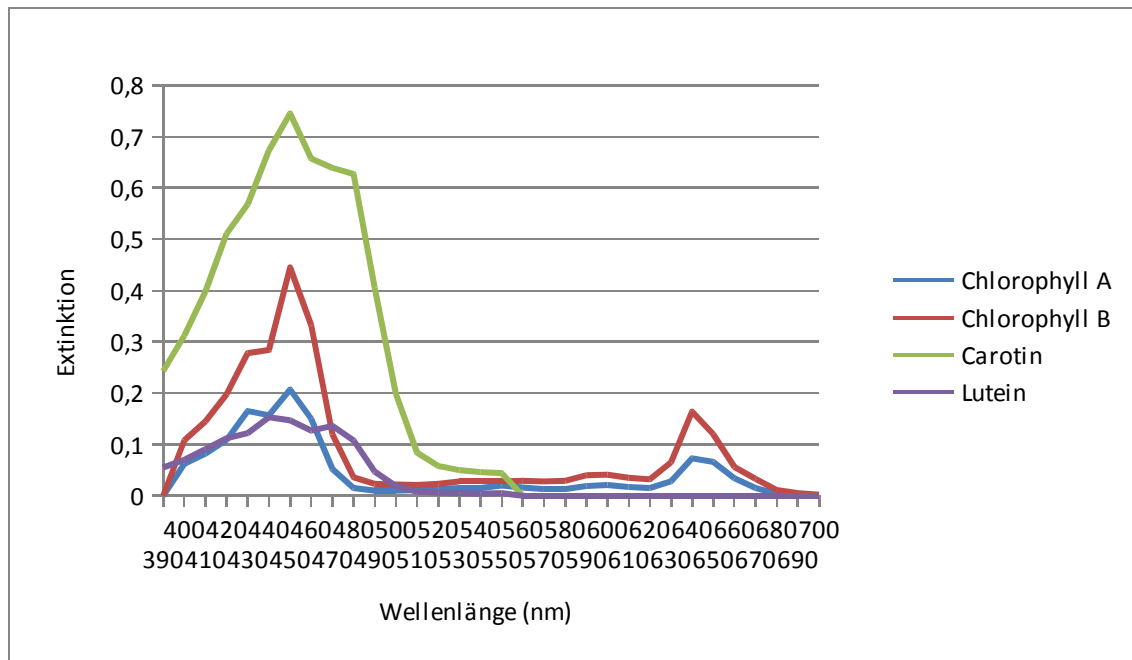


Abbildung 5: Lichtabsorption der der von der DC-Platte isolierten Pigmente

4.4 Chlorophyllgehaltsbestimmung

Im Gegensatz zu den Untersuchungen mittels Dünnschichtchromatographie (4.2) und der Spektrenanalyse (4.3) handelt es sich bei der Chlorophyllgehaltsbestimmung um eine Quantitätsbestimmung des Chlorophylls. Wie in Tabelle 2 zu erkennen, ist der Extinktionswert und der daraus errechnete Chlorophyllgehalt bei den belichteten deutlich höher als bei den etiolierten Keimlingen. Trotzdem ist Chlorophyll auch in den etiolierten Keimlingen in sehr geringen Mengen nachweisbar.

	beleuchtet	etioliert
Extinktionswert	0,472	0,007
Chlorophyllkonzentration (mg/ml)	0,3422	0,0051

Tabelle 2: Extinktionswert und Chlorophyllgehalt in beleuchteten sowie etiolierten Keimlingen

4.5 Proteinanalyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um auch den Effekt des Lichtes auf die Proteinexpression während der Keimung von Sonnenblumen zu untersuchen, wurden die löslichen und unlöslichen Eiweiße gewonnen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und untersucht.

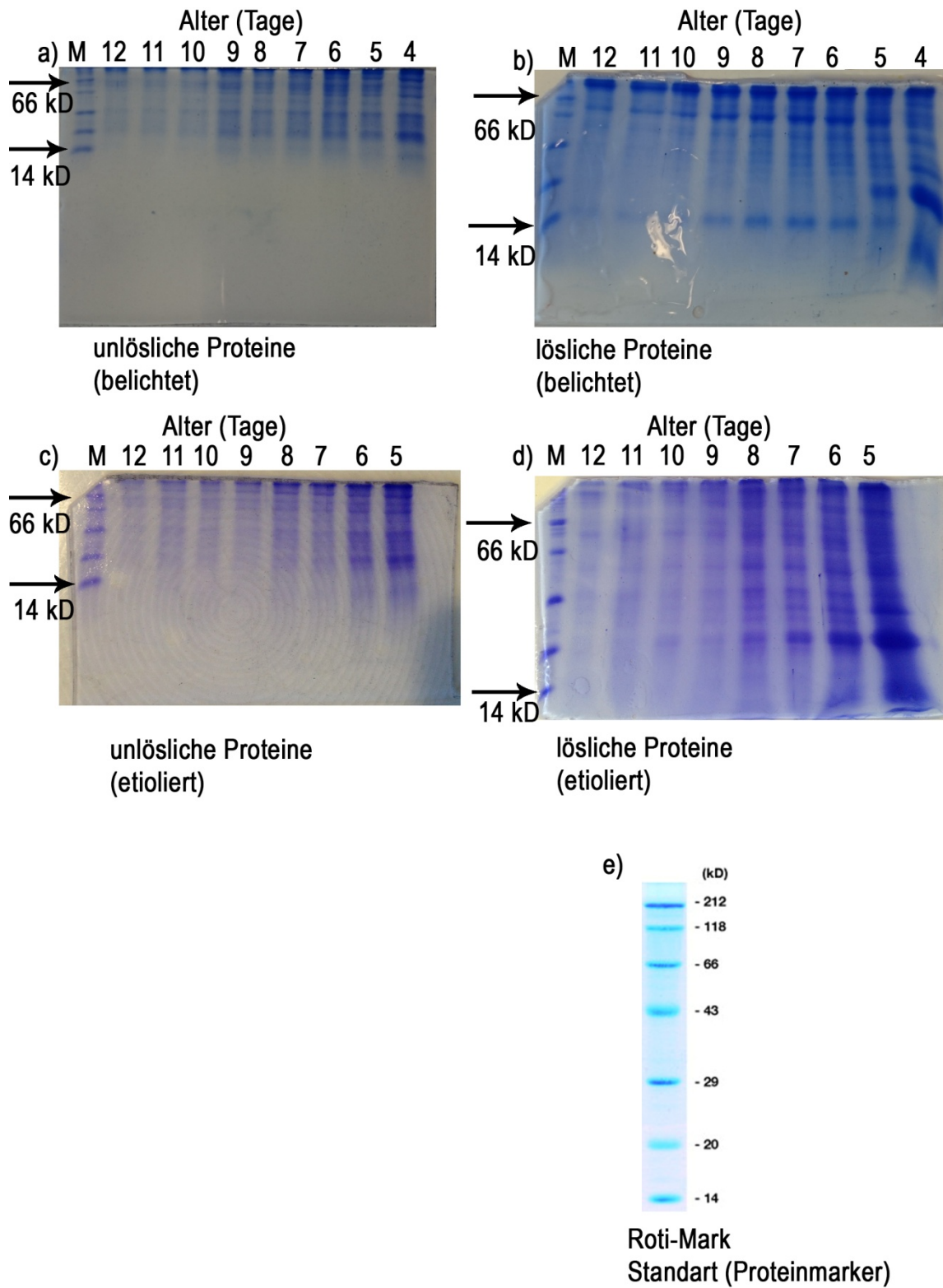


Abbildung 6: SDS-PAGE von belichteten und etiolierten Keimlingen

Auf der linken Seite der Trenngele ist jeweils der Proteinmarker zu erkennen, siehe Abbildung 6. Dieser dient der Größenordnung einzelner Banden im Trenngel und damit der Identifizierung der Proteine. So war es möglich, die zu dem RuBisCO Protein korrelierende Bande zu finden. Das RuBisCO Enzym hat eine Größe von 55 kD und ist bei allen Lebewesen, die Photosynthese betreiben, ein wichtiger Bestandteil der Dunkelreaktion. Das RuBisCO Protein wird hauptsächlich unter Einfluss von Licht hergestellt, entsprechend zeigen sich in den vorliegenden Versuchen die RuBisCO-Bande hauptsächlich bei belichteten Keimlingen (Abb. 6a und b). Den größeren Anteil beinhaltet aufgrund der stärkeren Intensität der Banden die Phase der löslichen Proteine (Abb. 6b). Allerdings synthetisieren auch die etiolierten Keimlinge in deutlich kleineren Mengen dieses Enzym (Abb.6 c und d). Des Weiteren wird aber auch deutlich, dass verschiedene Banden abhängig von der Zeit neu zu erkennen sind. Auch kann beobachtet werden, dass einzelne Proteine nach ein paar Tagen auch wieder verschwinden, wie zum Beispiel die Bande bei einer Größe von 14 kD in Abbildung 6 b. Darüber hinaus wird deutlich, dass im Laufe der Zeit die Konzentration der Proteine, bei allen Varianten der Proteingemische, abnimmt.

5 Diskussion

Durch Veränderungen der Genexpressionen können Pflanzen auf Stress reagieren, was zu phänotypischen Veränderungen führen kann. Lichtmangel ist ein möglicher Stressfaktor für Keimlinge, die zu Veränderungen der Proteinbiosynthese und der Entwicklung, welche in der vorliegenden Facharbeit untersucht wurden, führen. Im folgenden Teil werden die Versuchsergebnisse und deren mögliche Bedeutung für die Stressreaktion von Pflanzen diskutiert.

Bei der Beobachtung des Wachstums ist besonders auffällig, dass die Sonnenblumenkeimlinge unter Lichtmangel schneller in die Höhe wachsen (siehe 4.1). Um das überlebenswichtige Licht zu suchen, reagieren die Pflanzen auf ihre Umgebung und passen sich an. Auch wenn die Keimlinge zwar nicht mit Sicherheit dem Stress entgehen kann, besteht jedoch durch die Länge der Pflanzen eine höhere Wahrscheinlichkeit auf Licht zu treffen, um so zumindest den Stress zu reduzieren. Das Trockengewicht einer Pflanze gibt an, wie schwer die eigentliche Masse, d.h. ohne verdampfbare Flüssigkeiten (Wasser), ist. Dieses Gewicht setzt sich u.a. aus

Proteinen, Enzymen und Mineralien zusammen. Unter Frischgewicht versteht man das gesamte Gewicht eines Keimlings, d.h. die im Trockengewicht enthaltene Masse und das enthaltene Wasser. Subtrahiert man nun das Trockengewicht vom Frischgewicht, erhält man den Wasseranteil der Keimlinge. Bei der Messung des Frischgewichtes (Abb. 3) wurde deutlich, dass die etiolierten leichter waren als die belichteten Keimlinge. Die Messung des Trockengewichtes (Abb. 3) zeigte jedoch, dass die Keimlinge, egal ob etioliert oder beleuchtet, bei jedem Alter ungefähr gleich schwer waren. Die Keimlinge verfügen also bis 12 Tage nach der Einpflanzung ausschließlich über die Materialien und Energie, die ihnen mit dem Samen gegeben wurden. Auch wenn die Pflanzen in den ersten Tagen des Wachstums Proteine, z.B. RuBisCO, synthetisieren, müssen sie hierfür also auf die im Samen enthaltenen Grundbausteine zugegriffen haben. Eine weitere Schlussfolgerung aus der Bestimmung der Feucht- und Trockengewichte ist, dass die belichteten Keimlinge im Vergleich zu den etiolierten mehr Wasser für die Entwicklung aufgenommen haben.

Ein weiterer Hinweis auf die Veränderung der Pflanzeninhaltsstoffe unter Lichtmangel ist den Gelelektrophoresen (Abb. 6) zu entnehmen. Da die Proteinbanden mit dem Alter der Pflanzen bei allen untersuchten Bedingungen schwächer werden, kann man daraus schließen, dass die Konzentration der Proteine abgenommen hat. Die vorhandenen und neu synthetisierten Proteine werden offensichtlich mit immer mehr Wasser verdünnt. Zu diesen Schlussfolgerungen passt die zu beobachtende Zunahme des Frischgewichtes bei konstantem Trockengewicht aller untersuchten Keimlinge. Um quantitative Unterschiede der Proteinexpression zu beobachten, hätte man nicht die Proben mit der gleichen Menge Material der Pflanze mittels Gelelektrophorese untersuchen sollen, sinnvoller wäre daher die Beladung der Geltaschen mit Proben, die die gleiche Menge an Proteinen enthalten, gewesen. Hierzu hätte eine Messung der Proteinkonzentration der einzelnen Proben von der Gelelektrophorese erfolgen müssen.

Über die kurze Untersuchungszeit wurden nur geringe Unterschiede bezüglich der qualitativen Expression einzelner Proteine deutlich. Besonders auffällig sind die Veränderungen der Banden des RuBisCO Proteins. Dies ist bei etiolierten Pflanzen deutlich weniger exprimiert als bei den belichteten Keimlingen. Das RuBisCO Protein ist ein Enzym, welches für die Photosynthese von Pflanzen wichtig ist. Da etiolierte Pflanzen ohne Licht keine Photosynthese betreiben können, ist dieses Protein für unbelichtete Pflanzen nicht nutzbar. Eine Synthese des RuBisCO Proteins würde die begrenzten Energiereserven des Keimlings also unnötig belasten. Diese Energie wird

jedoch offensichtlich für beschriebene Anpassungsprozesse, wie z.B. das verstärkte Höhenwachstum, benötigt und eingesetzt.

Bei beleuchteten Keimlingen nimmt die Bande des RuBisCO Proteins mit dem Alter der Keimlinge zwar etwas ab, was am ehesten auf die zunehmenden Verdünnung der Proben über den Beobachtungszeitraum, wie oben diskutiert, zurückzuführen ist. Da die Abnahme der RuBisCO Bande im Vergleich zu den anderen Proteinen relativ gering ausfällt, kann dies als Hinweis auf eine kontinuierliche Synthese dieses Proteins bei beleuchteten Pflanzen gedeutet werden. Bei den Gelelektrophoresen wurde nicht nur auf den Unterschied zwischen belichteten und etiolierten Keimlingen geachtet, sondern auch auf lösliche und unlösliche Proteine. Die RuBisCO-Banden sind bei den belichteten Pflanzen zwar deutlich stärker in der Präparation der löslichen Proteine nachweisbar, aber doch auch bei den unlöslichen Proteinen zu erkennen. Allerdings ist RuBisCO eigentlich ein "wasserlösliche[s] Protein" (www.da.wikipedia.com) und sollte daher nur auf dem Trenngel der löslichen Proteine nachweisbar sein. Die Beobachtung von RuBisCO in den Fraktionen unlöslicher Proteine liegt am ehesten daran, dass bei der Erstellung der Proben dieses Protein noch an Pflanzenmaterial, das unlöslich in Wasser vorlag, gebunden war.

Farbpigmente spielen bei verschiedenen physiologischen Prozessen in der Zelle eine entscheidende Rolle, z.B. Zellatmung, Sauerstofftransport und eben auch bei der Photosynthese (www.de.wikipedia.org). Es wurde daher auch der Einfluss des Lichtes auf die Bildung von Farbpigmenten bei der Keimung von Erbsen untersucht. Bei der Dünnschichtchromatographie zeigte sich, dass in etiolierten im Gegensatz zu belichteten Pflanzen fast keine Pigmente vorhanden sind. Der Befund weist darauf hin, dass etiolierte Pflanzen auch diese, für die Photosynthese notwendigen Komponenten gar nicht erst bilden.

Die mittels der Rf-Werte in den belichteten Pflanzen vermuteten Pigmente sollten durch die Spektralanalyse und den Vergleich mit Literaturwerten (Praktikumsvorschrift) bestätigt werden. Hierbei zeigte sich allerdings, dass alle Farbpigmente ungefähr bei der gleichen Wellenlänge einen Hochpunkte hatten. Nach dem Vergleich mit den Literaturwerten (Praktikumsvorschrift) bestätigte sich, dass es sich nicht um Spektren der vermuteten Pigmente handelte. Weitere Schlussfolgerungen konnten aus diesen Ergebnissen aus diesem Grund nicht gezogen werden.

Die Ergebnisse könnten verfälscht sein, da entgegen der Versuchsvorschrift gewartet wurde bis sich die Pigmentmischung durch spontane Verdunstung auf ca. 0,5ml eingengt hatte (3.3). Laut Versuchsvorschrift hätte man allerdings die Flüssigkeit mit Hilfe eines Kaltluftföns auf die gewünschte Menge einengen sollten. Durch den

längeren Zeitraum der spontanen Verdunstung kann es sein, dass die Pigmente oxidierten (Schaller, pers. Mitteilung). Ferner ist aber nicht auszuschließen, dass die Banden auf der DC-Platte nicht korrekt aufgetrennt waren und die gesuchten Farbpigment mit anderen Banden aus der DC-Platte verwechselt wurden. Hierzu passend fanden sich auf der DC-Platte mehr Banden im Vergleich zu den Literaturwerten (Praktikumsvorschrift). Auch dies könnte in einer Oxidation der Pigmente begründet sein. Ein weiterer Grund könnten auch Fehlermessungen sein, wofür ein nicht genauer Nullabgleich ursächlich sein könnte. Ein ungenauer Nullabgleich kann durch eine verschmutzte oder nicht ausreichend gefüllte Küvette entstehen. Durch eine verschmutzte Küvette würden auch bei der Messung Fehler hervorgerufen, auch wenn der Nullabgleich dem Ideal entsprechen würde.

Pflanzen reagieren Veränderungen ihres Umfeldes mit einer Anpassung der Stoffwechselforgänge und ihrer Entwicklung. Nicht nur Lichtmangel führt zu Stress, sondern auch Lichtüberschuss, Hitze bzw. Kälte, zu hohe Salzkonzentration im Boden oder auch die Belastung mit Schadstoffen. Pflanzen versuchen durch Anpassung die Folgen des Stresses zu reduzieren. Die etiolierten Pflanzen sind in der vorliegenden Arbeit, wie oben beschrieben, in die Höhe gewachsen. Die Pflanzen wachsen entgegen der Schwerkraft mit Hilfe der Reservestoffe im Samen. Dieser Vorgang hält so lange an, bis diese Energiereserven aufgebraucht sind. Wenn die Pflanzen bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht auf Licht gestoßen sind, sterben sie ab. Solange sie noch kein Licht zur Verfügung haben, können sie keine Photosynthese betreiben. Aus diesem Grund sparen sie auch Energie indem die Pflanzen Chloroplasten erst gar nicht ausbilden. Auch Farbpigmente wie Chlorophyll werden nicht hergestellt. Als Folge sind die etiolierten Keimlinge nahezu farblos. In der aktuellen Untersuchung war in den unbelichteten Keimlingen Chlorophyll allerdings in geringen Mengen messbar (Tabelle 1). Dieser überraschende Befund könnte dadurch zu erklären sein, dass zum Zeitpunkt der Messung der kurze Kontakt der Pflanzen zu Licht bereits den Beginn einer Synthese von Chlorophyll stimuliert hatte.

Bei jeder Art von Belastungen, die zu einem Energiedefizit führt, ruft das Snf1 bezogene-Kinase1 (SnRK1) Protein Änderungen der Transkription hervor (<http://cordis.europa.eu>). Lichtmangel gehört auch zu den Stressfaktoren, die zu einem Energiemangel führt, da durch mangelnde Photosynthese keine neue Energie hergestellt werden kann. Das SnRK1 Protein dient zur Wiederherstellung der metabolischen und energetischen Homöostase. Auch bei den vorliegenden Untersuchungen konnte eine Veränderung der Proteinexpressionen bei etiolierten Pflanzen beobachtet werden. Mit Hilfe solcher Mechanismen können die Zellen länger

unter diesen Bedingungen überleben und generieren dadurch für die Pflanze mehr Zeit, um sich an die ungünstigen Rahmenbedingungen anzupassen (<http://cordis.europa.eu>). Von einem besseren Verständnis der Stress-induzierten Anpassungsprozessen erhofft man sich, zukünftig Stress-resistentere Pflanzen züchten zu können (Hu et al, 2015). Solche Ansätze mögen insbesondere in der Landwirtschaft von großer Bedeutung sein, da es durch Stressfaktoren wie Dürre, Hitze oder Kälte immer wieder zu enormen Ertragsausfällen kommt.

Die bestehende Versuchsvorschrift im Fach Biologie zu dem Thema "Etiolement-Chromatographie-Spektren" wurde in der vorliegenden Arbeit erfolgreich angewandt. Sie war für Schüler verständlich und gab ein adäquates Maß an Hintergrundinformationen. Einzelne Details wurden in den Versuchsanweisungen modifiziert. Auch wurde deutlich wie wichtig es ist, sich auch an die Details der Versuchsanleitung zu halten, so kam es bei den hier beschriebenen Versuchen möglicherweise durch eine abgewandelte Art der Einengung (spontane Verdunstung statt Verdunstung unter Kaltluftfön) und die damit verbundene längere Standzeit zu einer Oxidation der Farbpigmente, die die Aussagekraft der Ergebnisse deutlich reduzierte.

6 Zusammenfassung

Veränderungen der Umwelt, wie z.B. Lichtmangel, können Stressfaktoren für Pflanzen darstellen. Die Anpassung von Sonnen- und Erbsenkeimlingen bei Photo- bzw. Skotomorphogenese in Bezug auf Wachstum, Synthese von Farbpigmenten und der Proteinexpression war Gegenstand der vorliegenden Facharbeit.

Phänotypisch auffällig war ein verstärktes Längenwachstum und eine Farblosigkeit der etiolierten Keimlinge. Entsprechend konnte in der Dünnschichtchromatographie gezeigt werden, dass die Farbpigmente fast ausschließlich bei belichteten Keimlingen nachweisbar waren. Die Proteinanalyse mittels SDS-PAGE zeigte eine Veränderung des Proteinexpressionsmusters unter den Bedingungen der Skotomorphogenese. Auffällig war hier insbesondere eine geringere Expression des für die Photosynthese wichtigen Enzyms RuBisCO.

Die Versuchsergebnisse machen deutlich, dass ein wesentlicher Unterschied der Photo- und Skotomorphogenese darin besteht, dass fast ausschließlich nur die belichteten Keimlinge die für die Photosynthese notwendigen Enzyme und Farbpigmente synthetisieren. Die etiolierten Keimlinge wenden hingegen die im Samen enthaltene begrenzte Energiemenge dazu auf, um durch Längenwachstum Licht zu erreichen, um so dem lebensbedrohlichen Stressfaktor Lichtmangel zu entgehen.

Im Rahmen der Arbeit wurde die als Grundlage dienende Praktikumsvorschrift evaluiert und an entsprechenden Stellen angepasst und ergänzt.

7 Quellenverzeichnis

<http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/pflanzenstress/50712>

Zugriff: 09.10.2015, letzte Änderung: 1999

<https://de.wikipedia.org/wiki/RuBisCO>

Zugriff: 27.10.2015, letzte Änderung: 28.8.2015

http://cordis.europa.eu/result/rcn/86365_de.html

Zugriff: 29.10.2015, letzte Änderung: 21.03.2011

Junjie Hu, Christoph Rampitsch und Natalia V. Bykova: Advances in plant proteomics toward improvement of crop productivity and stress resistance, *Front. Plant Sci.* 6: 1-15, 2015

Ariane Schmücker: Skoto- und Photomorphogenese bei Sonnenblumenkeimlingen. Facharbeit im Bereich Biologie 2014, Schiller-Schule Bochum

8 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen Hilfsmittel als angegeben verwendet habe. Insbesondere versichere ich, dass ich alle wörtlichen und sinngemäßen Übernahmen aus anderen Werken als solche kenntlich gemacht habe.

Ort, Datum: _____ Unterschrift: _____