

**Aufreinigung und Charakterisierung des D1-Proteins aus dem
Photosystem II höherer Pflanzen:
Entwicklung eines Biosensors auf der Basis der
Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technologie**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Carmen Schulten

aus

Bonn

Bonn 2006

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. H. Schnabl
2. Referent: Prof. Dr. D. Volkmann

Tag der Promotion: 19.10.2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2006

1	Einleitung	5
1.1	Photosystem II	7
1.2	D1-Protein – die biologische Einheit des Biosensors	12
1.3	Q _B -Bindenische des D1-Proteins - Bindung von PS-II-Herbiziden an die Q _B -Bindenische	16
1.4	Photosystem-II-Herbizide	19
1.5	Biosensoren für den Nachweis von ökotoxikologischen Substanzen	22
1.5.1	Biosensoren für den Nachweis von Herbiziden/PS-II-Inhibitoren	23
1.5.2	D1-Biosensor	25
1.5.3	Einsatz von Biosensoren in der Umweltüberwachung	25
1.6	Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR)	26
1.7	Kopplung des biosensorischen Nachweises von Herbiziden mit der klassischen Analytik – SPR-MS	27
1.8	Zielsetzung: Entwicklung einer geeigneten Aufreinigungsmethode für das D1-Protein zum Einsatz als biologische Einheit in einem SPR-Biosensor zum Nachweis von PS-II-Herbiziden	29
2	Material und Methoden	31
2.1	Verwendete Pflanzenspezies	31
2.2	Anzuchtbedingungen	31
2.2.1	Anzucht in Klimakammern am IMBIO	31
2.2.2	Anzucht im Gewächshaus bei caesar	31
2.3	Thylakoidisolationmethoden	32
2.3.1	Thylakoidisolation nach Cohen & Baxter (1990)	32
2.3.2	Thylakoidisolation nach Bassi <i>et al.</i> (1985)	33
2.3.3	Thylakoidisolation nach Piletskaya <i>et al.</i> (1997)	34
2.4	Isolation von Photosystems-II-Proteinkomplexen nach Piletskaya <i>et al.</i> (1997)	34
2.5	Aufreinigung des D1-Proteins aus dem PS-II-Proteinkomplex mittels Fast protein liquid chromatography (FPLC)	35
2.5.1	D1-Protein-Aufreinigung nach der Methode von Sharma <i>et al.</i> (1997a)	36
2.5.2	D1-Protein-Aufreinigung nach der Methode von Piletskaya <i>et al.</i> (1997)	36
2.6	Bestimmung des Chlorophyllgehaltes der Thylakoide nach Arnon (1949)	37
2.7	Fluoreszenzmessungen mit der Puls-Amplituden-Modulation	38
2.7.1	Vitalitätsbestimmung der isolierten Thylakoide über Fluoreszenzmessung mit der Puls-Amplituden-Modulation	38
2.7.2	Messung von Herbiziden mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor über die Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometrie	39
2.8	Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford (1976)	40
2.9	Lyophilisation von PS-II-Proteinkomplexen, D1-Proteinen sowie FPLC-Fraktionen	41
2.10	Konzentrierung von PS-II-Proteinkomplexen und FPLC-Fraktionen	42
2.10.1	Vakuumzentrifugation von FPLC-Fraktionen	42
2.10.2	Konzentrierung von PS-II-Proteinkomplexen über Konzentrierungseinheiten	42
2.11	Filtration von PS-II-Proteinkomplexen	43

2.12	Dialyse von PS-II-Proteinkomplexen	44
2.13	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
2.13.1	Probenvorbereitung	44
2.13.2	Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	45
2.13.3	Färbung der Gele mit Coomassie®-Brilliantblau	46
2.13.4	Geldokumentation	46
2.14	Western-Blotting	47
2.15	Synthese einer Simazinhexansäure nach Goodrow <i>et al.</i> (1990)	49
2.15.1	Erster Schritt der Synthese	49
2.15.2	Zweiter Schritt der Synthese	49
2.15.3	Dünnschichtchromatographie (DC)	50
2.15.4	NMR-Spektroskopie der 6-{{4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl}amino}-hexansäure	50
2.16	Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) – Biacore® 3000	51
2.16.1	Zur Theorie der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR)	51
2.16.1.1	Totale interne Reflexion	51
2.16.1.2	Oberflächen-Plasmon	51
2.16.1.3	Evaneszente Wellen	52
2.16.1.4	Biomolekulare Interaktionen	53
2.16.2	Biacore-Technologie/Biacore® 3000	54
2.16.2.1	Sensorchip-Technologie	56
2.16.2.2	Mikroflusssystem/Integrated μ -Fluidic Cartridge (IFC)	56
2.16.2.3	Optisches System	59
2.16.2.4	Biacore® 3000 Control Software	59
2.16.2.5	BIAevaluation Software	59
2.16.3	SPR-Messungen mit dem Anti-D1-Antikörper-Chip	60
2.16.3.1	Aminkopplung eines Anti-D1-Antikörpers	60
2.16.3.2	Präkonzentrierung der Liganden an der Chipoberfläche	61
2.16.3.3	Untersuchung von FPLC-Fractionen auf die Anwesenheit von D1-Protein über den SPR-Anti-D1-AK-Chip	62
2.16.4	SPR-Messungen mit dem Simazinhexansäure-Chip	63
2.16.4.1	Oberflächenthiolekopplung der 6-{{4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl}amino}-hexansäure an einen C1-Chip	63
2.16.4.1.1	Modifizierung des Simazinhexansäure-Liganden	63
2.16.4.1.2	Modifizierung der Chipoberfläche	64
2.16.4.1.3	Immobilisierung des Liganden an der Chipoberfläche	65
2.16.4.1.4	Abblocken der aktiven Thiolgruppen	66
2.16.4.2	Nachweis der kovalenten Kopplung der Simazinhexansäure über einen Anti-Triazin-Antikörper	66
2.16.4.3	Qualitativer Nachweis der Bindefähigkeit des aufgereinigten D1-Proteins über den Simazinhexansäure-Chip	67
2.16.5	SPR-Nachweis von Herbiziden über einen D1-Protein-Chip/PS-II-Proteinkomplex-Chip	67
2.16.5.1	Kopplung der D1-Proteine bzw. der PS-II-Proteinkomplexe an einen CM5-Chip über die Aminkopplungsmethode	67
2.16.5.2	Messung der Herbizide am D1-Protein-Chip/PS-II-Proteinkomplex-Chip	68
2.17	Biacore-MS-Kopplung/Analyte recovery mit dem Biacore® 3000	69
2.17.1	Testsystem Peroxidase \leftrightarrow Anti-Peroxidase-Antikörper	70
2.17.2	Biacore analyte recovery	70
2.17.3	Massenspektrometrische Messungen der Peroxidase	71
3	Ergebnisse	73
3.1	Isolation von Thylakoidmembranen	74
3.1.1	Vitalität der Thylakoide	74
3.1.2	Nachweis von D1-Protein in Thylakoidextrakten über Western-Blotting	76
3.1.3	Proteingehalte der PS-II-Proteinkomplexe	77
3.1.4	Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse in Hinblick auf die weiteren Aufreinigungsschritte des D1-Proteins	80

3.2	Extraktion von PS-II-Proteinkomplexen	82
3.2.1	Nachweis von D1-Protein in PS-II-Proteinkomplexen aus nach Piletskaya <i>et al.</i> (1997) hergestellten Thylakoiden	82
3.2.1.1	Vergleich der PS-II-Proteinkomplexe über SDS-PAGE	82
3.2.1.2	Exemplarischer Vergleich von ausgewählten PS-II-Proteinkomplex-Extrakten über SDS-PAGE und Western-Blotting	85
3.2.2	Nachweis von D1-Protein in PS-II-Proteinkomplexen aus nach Cohen & Baxter (1990) hergestellten Thylakoiden	87
3.2.2.1	Vergleich der PS-II-Proteinkomplexe über SDS-PAGE	87
3.2.2.2	Western-Blotting von PS-II-Proteinkomplexen	88
3.2.3	Nachweis von D1-Protein in PS-II-Proteinkomplexen aus nach Bassi <i>et al.</i> (1985) hergestellten Thylakoiden	88
3.2.4	Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse im Hinblick auf die weiteren Aufreinigungsschritte des D1-Proteins aus dem PS-II-Proteinkomplex	89
3.3	Aufreinigung des D1-Proteins aus dem PS-II-Proteinkomplex	91
3.3.1	Nachweis von nach der Methode von Sharma <i>et al.</i> (1997a) aufgereinigtem D1-Protein über SDS-PAGE und Western-Blotting	91
3.3.1.1	D1-Protein-Aufreinigung von <i>Vicia faba</i>	91
3.3.1.2	D1-Protein-Aufreinigung von <i>Pisum sativum</i>	95
3.3.1.3	D1-Protein-Aufreinigung von <i>Lactuca sativa</i>	98
3.3.1.4	Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse über SDS-PAGE und Western-Blotting im Hinblick auf die Aufreinigung des D1-Proteins über die Methode nach Sharma <i>et al.</i> (1997a)	99
3.3.2	Nachweis von nach der Methode von Sharma <i>et al.</i> (1997a) aufgereinigtem D1-Protein über SPR-Messungen mit einem Anti-D1-Antikörper-Chip	101
3.3.3	FPLC-Auftrennung von PS-II-Proteinkomplexen nach der Methode von Piletskaya <i>et al.</i> (1997)	105
3.4	Entwicklung einer SPR-Methode zum qualitativen Nachweis der Bindefähigkeit des aufgereinigten D1-Proteins zu PS-II-Herbiziden	106
3.4.1	Synthese des Simazinderivates	106
3.4.2	Kopplung des Simazinderivates an einen C1-Chip – Nachweis der Immobilisierung über einen Anti-Triazin-Antikörper	108
3.4.3	Auswertung der Affinität und der Kinetik der Anti-Triazin-Antikörper-Bindung an den Simazinderivat-Chip	109
3.4.3.1	Affinitätsauswertung der Anti-Triazin-Antikörper-Bindung an den Simazinderivat-Chip	110
3.4.3.2	Kinetische Auswertung der Anti-Triazin-Antikörper-Bindung an den Simazinderivat-Chip	110
3.4.4	Überprüfung der Bindungseigenschaften des Simazinderivates zur Q _B -Bindenische mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor	112
3.4.5	Qualitativer Nachweis der Bindefähigkeit von aufgereinigtem D1-Protein zu einem PS-II-Herbizid über einen Simazinderivat-Chip mittels SPR	114
3.4.5.1	D1-Protein-Aufreinigung von <i>Vicia faba</i>	114
3.4.5.2	D1-Protein-Aufreinigung von <i>Lactuca sativa</i>	117
3.4.5.3	D1-Protein-Aufreinigung von <i>Pisum sativum</i>	118
3.4.5.4	Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse der SPR-Messungen mit dem Simazinderivat-Chip	118
3.5	Zusammenfassende Betrachtung des Nachweises von D1-Protein über die Methoden der SDS-PAGE, des Western-Blottings und der SPR mit Anti-D1-Antikörper- und Simazinderivat-Chip	118
3.6	Einsatz des D1-Proteins für den biosensorischen Nachweis von Herbiziden mit der Methode der Oberflächen-Plasmon-Resonanz	120
3.6.1	Biosensorischer Nachweis von Atrazin mit D1-Protein und PS-II-Proteinkomplexen mittels SPR	121
3.6.2	Vergleich der Bindungsspezifität von Diuron, Atrazin und Metribuzin zu D1-Protein über den biosensorischen Nachweis mittels SPR	124

3.7	SPR-MS-Kopplung am Beispiel des pflanzlichen Testsystems Peroxidase und Anti-Peroxidase-Antikörper	127
3.7.1	Biacore analyte recovery von pflanzlicher Peroxidase – Bestimmung der Elutionsmenge über die SPR	128
3.7.2	Massenspektrometrische Messungen der eluierten pflanzlichen Peroxidase – Massenspektrometrische Bestimmung der Elutionsmenge	129
4	Diskussion	131
4.1	Beurteilung der Thylakoidisolation und PS-II-Proteinkomplex-Extraktion für die Verwendung des D1-Proteins als biologische Einheit in einem SPR-Biosensor	133
4.1.1	Vergleich der Thylakoidisolationmethoden	133
4.1.2	PS-II-Proteinkomplex-Extraktion	135
4.1.3	Vergleich ausgewählter Pflanzenspezies	140
4.1.4	Einfluss ausgewählter Anzuchtbedingungen	144
4.2	Beurteilung der D1-Protein-Aufreinigung für die Verwendung des D1-Proteins als biologische Einheit in einem SPR-Biosensor	147
4.2.1	Vergleich ausgewählter Pflanzenspezies	157
4.3	Entwicklung einer SPR-Methode zum qualitativen, über einen Simazinderivat-Chip geführten Nachweis der Herbizid-Bindfähigkeit des aufgereinigten D1-Proteins	159
4.4	D1-Protein als biologische Einheit zur Entwicklung eines SPR-Biosensors zum Nachweis von PS-II-Herbiziden – Direkter Nachweis	163
4.5	Beurteilung des biosensorischen Nachweises von PS-II-Herbiziden über das D1-Protein in realen Gewässerproben – Ausblick	169
4.6	Beurteilung der SPR-MS-Kopplung für Ihren Einsatz zur Kopplung des biosensorischen Nachweises von Herbiziden mit der klassischen Herbizidanalytik – Wirkungsbezogene Analytik	171
5	Zusammenfassung	175
6	Literaturverzeichnis	179
7	Anhang	205
7.1	Übersicht über die isolierten PS-II-Proteinkomplex-Extrakte	205
7.2	Übersicht über die durchgeführten SPR-Messungen mit Anti-D1-Antikörper-Chips	207
7.3	Hemmung des PET durch PS-II-Inhibitoren	209
7.4	Small-molecules-MDL-Methode	210
7.5	SDS-Polyacrylamidgele von PS-II-Proteinkomplexen aus nach der Piletskaya-Methode isolierten Thylakoiden	214
7.6	Übersicht über die verwendeten Thylakoidisolate	215
8	Chemikalienverzeichnis	217
9	Abkürzungs- und Wortverzeichnis	221

1 Einleitung

Die so genannten Pflanzenschutzmittel (Pestizide) werden in der Landwirtschaft und im privaten Bereich zum Schutz der angebauten Kulturpflanzen vor Insekten, Pilzen oder konkurrierendem Wildwuchs in großen Mengen eingesetzt.

Unkräuter sind immer noch ein limitierender Faktor im Pflanzenanbau auf der ganzen Welt. Inzwischen ist der Gebrauch von Herbiziden, besonders in den industrialisierten Ländern, die primäre Methode zur Unkrautkontrolle geworden (Eckes *et al.*, 2004). Der Herbizidmarkt stellt dabei mit ca. 13 Milliarden US \$ Umsatz (Daten von 2004) das größte Segment des weltweiten Pflanzenschutzmittelmarktes mit 32,2 Milliarden US \$ (Daten von 2004) dar (Eckes *et al.*, 2004; IVA, 2005). Alleine in der Europäischen Union (EU) bilden die Herbizide mit einem Umsatz von 2,7 Milliarden € und damit einem Marktanteil von 41 % (Daten von 2004) die wichtigste Produktgruppe im europäischen Pflanzenschutzmittelmarkt (IVA, 2005). Die Anwendung von Herbiziden in der Landwirtschaft hat in den letzten Jahrzehnten beträchtlich zugenommen. Dies hat eine massive Verschmutzung von Wasser (Abwasser, Grundwasser, Oberflächenwasser, Trinkwasser) und Boden zur Folge. Alleine in Deutschland wurden im Jahre 2004 ca. 85.000 Tonnen Herbizide produziert und ca. 15.000 Tonnen auf landwirtschaftlichen Nutzflächen sowie in privaten Bereichen ausgebracht (IVA, 2005).

Zur Anwendung werden die Mittel oft großflächig auf die betroffenen Oberflächen aufgebracht. Ein Teil der Wirkstoffe wird mit dem Regen wieder ausgetragen und gelangt in Oberflächengewässer, über Verdunstung in die Luft und über Versickerung ins Grundwasser und die Böden. Dabei kommt es zu einer Anreicherung der Substanzen im Grundwasser, im Trinkwasser, in Oberflächengewässern und in Böden. Diese Chemikalien sind sehr stabil in den Böden und werden durch Kolloide und organische Substanzen, auf der Basis ihrer Fähigkeit Kationen auszutauschen, adsorbiert (Giardi *et al.*, 2001). Da die Herbizide in hohem Grade toxisch für Menschen und Tiere und damit das Ökosystem sind, hat ihr wahlloser Gebrauch ernsthafte Auswirkungen auf die Umwelt. Damit stellen die Pestizide und insbesondere die Herbizide eine immer weiter zunehmende Gefährdung für den Menschen und die Ökosysteme dar. Daher spielt der Schutz der menschlichen Gesundheit und der Umwelt eine wichtige Rolle und der Gesetzgeber hat sehr strenge und niedrige Grenzwerte für Pestizide im Trinkwasser festgelegt. So darf nach der deutschen und europäischen Trinkwasserverordnung (Trinkwasserverordnung der Europäischen Union, 1980; Trinkwasserverordnung Deutschland, 1990) die Summe aller Pestizide im Trinkwasser den Grenzwert von 0,5 µg/l nicht überschreiten. Für Einzelstoffe gilt ein Grenzwert von 0,1 µg/l.

Zusätzlich wurden einige Herbizide, wie z. B. Dinoseb und Atrazin, aufgrund ihres hohen gesundheitlichen Gefährdungspotentials in manchen Ländern verboten. Daher spielt die Überwachung der Umwelt, wie Grund-, Oberflächen- und Trinkwasser, Luft und Böden, eine bedeutende Rolle, um die Gesundheit des Menschen und der Ökosysteme zu schützen.

Mit der modernen chemischen Analytik ist nur eine Erfassung bereits bekannter Schadstoffe möglich. Unbekannte und eventuell noch stärker toxisch wirkende Abbau- und Umbauprodukte von Herbiziden können mit den klassischen chemischen Analyseverfahren nicht erfasst werden.

Für die phytotoxische Wirkung der Photosystem-II-Herbizide (PS-II-Herbizide) ist ihre Bindung an die Q_B -Bindenische des D1-Proteins im Photosystem II (PS II) verantwortlich. Durch diese Bindung kommt es zu einer Blockierung des photosynthetischen Elektronentransports in der Thylakoidmembran. Das D1-Protein ist damit der natürliche Bindungspartner der Photosystem-II-inhibierenden Herbizide. Die Stärke des phytotoxischen Effektes ist dabei abhängig von der Struktur des jeweiligen Herbizids und damit von seiner Bindungsaffinität zur Q_B -Bindenische. Die Tatsache, dass die PS-II-Herbizide am D1-Protein angreifen, macht das D1-Protein damit zu einer guten biologischen Einheit für die Detektion von Herbiziden und anderen phytotoxischen Substanzen, die über die Q_B -Bindenische wirken. Damit bietet sich eine einzigartige Möglichkeit, das D1-Protein als biologische Einheit in einem Biosensor zur wirkungsbezogenen Detektion von phytotoxischen Substanzen einzusetzen (Obst und Brenner-Weiß, 2002), die ihre Wirkung durch Bindung an die Q_B -Bindenische entfalten.

Mit einem Biosensor basierend auf einer biologischen Einheit des D1-Proteins könnten damit Umweltproben über ihr Wirkpotential auf die Anwesenheit von bekannten wie auch bisher noch unbekanntem und eventuell noch stärker toxisch wirkenden PS-II-Inhibitoren untersucht werden. Hier ist jedoch nur ein Nachweis der Substanzen als Summenparameter über ihr Wirkpotential auf die biologische Einheit möglich. Um diese nachgewiesene Substanz genauer zu identifizieren, ist eine Kopplung mit der klassischen chemischen Analytik notwendig. Basierend auf der biologischen Einheit des D1-Proteins wäre es damit in Zukunft eventuell möglich, einen Biosensor für das schnelle Pre-Screening von Umweltproben auf Photosystem-II-Inhibitoren zu entwickeln. Dieser könnte kostspielige und zeitaufwendige chemische Analysen minimieren oder sogar ganz ersetzen, da die Analysen auf die Proben mit positivem Nachweis in der Biosensorik beschränkt werden könnten.

Ein solcher Biosensor hätte damit das Potential, in der Beurteilung/Abschätzung der allgemeinen Toxizität und dem Pre-Screening einer großen Anzahl an Umweltproben eingesetzt zu werden, um die komplexen chemischen Analysen zu bündeln.

1.1 Photosystem II

Der photosynthetische Apparat von höheren Pflanzen, Algen und Cyanobakterien ist ein hoch komplexes System. Es besteht aus einer Anzahl an Multiproteinkomplexen, die in der Thylakoidmembran der Chloroplasten eingebettet sind. Einer dieser Multiproteinkomplexe ist das Photosystem II (PS II). Es verwendet Lichtenergie für die Reduktion von Plastochinon, die Oxidation des Wassers und die Bildung eines Transmembran-pH-Gradienten. Dabei katalysiert das Photosystem II über die Lichtanregung eine Serie an Elektronen-Transfer-Reaktionen, die in der Aufspaltung von Wasser in Sauerstoff, Protonen und Elektronen resultieren. Dies ist die stärkste bisher bekannte, oxidierende Reaktion, die in der Biologie auftritt. Diese Reaktionen sind verantwortlich für die Produktion von atmosphärischem Sauerstoff und damit indirekt auch für die Bildung von Biomasse auf unserem Planeten (Hankamer *et al.*, 1997b).

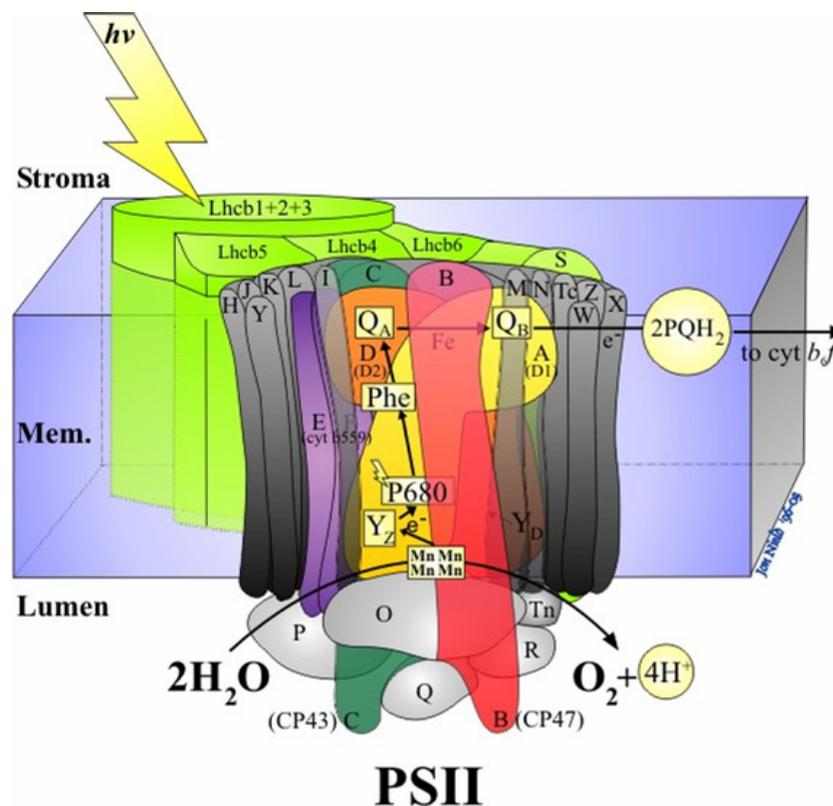
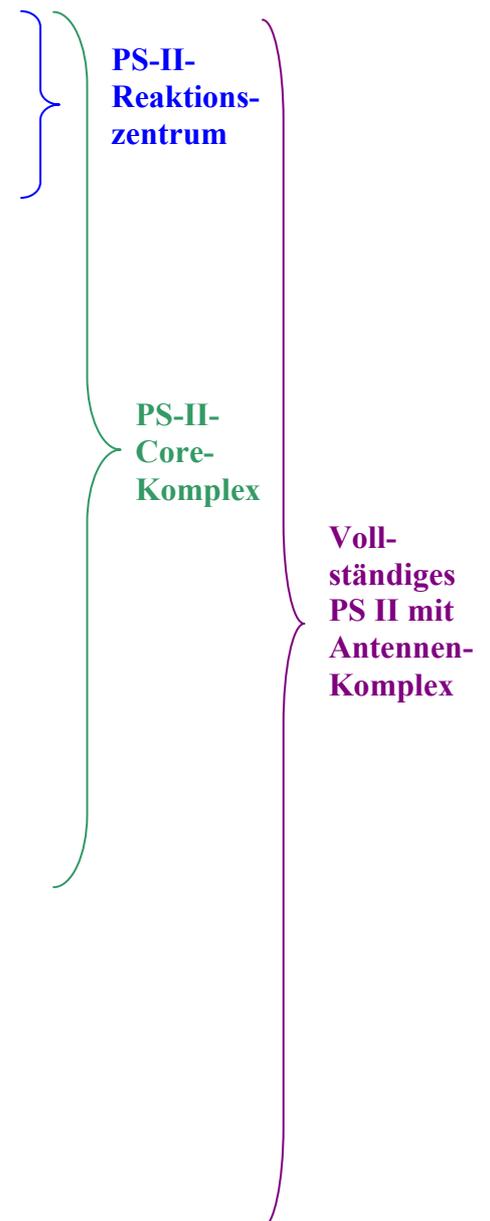


Abb. 1.1: Abbildung der Struktur und Zusammensetzung des PS II höherer Pflanzen. Die Proteine des PS-II-Core-Komplexes, eingeschlossen der extrinsischen Proteine des Sauerstoff-entwickelnden-Komplexes, sind entsprechend der Genomenklatur benannt (z. B. *psbA* = A), mit den allgemeinen Abkürzungen für die Haupt-Untereinheiten (z. B. A = D1-Protein). Die äußeren Light-harvesting-Proteine sind hellgrün gefärbt (intrinsische Lhcb-Proteine). Der Elektronentransfer-Weg von der Wasseroxidation zur Plastochinonreduktion (PQH₂) ist angegeben. Der Elektronentransportweg ist mit Pfeilen eingezeichnet. Das D1-Protein ist gelb dargestellt. Quelle: www.bio.ic.ac.uk/research/barber/psIIimages/psII.html.

Der Membranproteinkomplex des Photosystem II besteht aus mehr als 25 verschiedenen Protein-Untereinheiten (s. Abb. 1.1) (Barber *et al.*, 1997; Hankamer *et al.*, 1997b). Tabelle 1.1 gibt eine Übersicht über die derzeit bekannten Untereinheiten des PS II mit den bekannten Genen, die diese kodieren, den Molekulargewichten und der Anzahl der Transmembranhelices, die diese bilden.

Gen	Untereinheit	Molekulargewicht [Da]	Anzahl an Transmembran- α -Helices
<i>psbA</i>	D1-Protein	38.021 (S)	5
<i>psbD</i>	D2-Protein	39.418 (S)	5
<i>psbE</i>	α -Cytochrom <i>b-559</i>	9.255 (S)	1
<i>psbF</i>	β -Cytochrom <i>b-559</i>	4.409 (S)	1
<i>psbI</i>	I-Protein	4.195 (S)	1
<i>psbB</i>	CP47	56.278 (S)	6
<i>psbC</i>	CP43	50.066 (S)	6
<i>psbH</i>	H-Protein	7.697 (S)	1
<i>psbK</i>	K-Protein	4.283 (S)	1
<i>psbL</i>	L-Protein	4.366 (S)	1
<i>psbM</i>	M-Protein	3.755 (S)	1
<i>psbN</i>	N-Protein	4.722 (Ta)	1
<i>psbO</i>	33-kDa-ext.-Protein	26.539 (S)	0
<i>psbP</i>	23-kDa-ext.-Protein	20.210 (S)	0
<i>psbQ</i>	16-kDa-ext.-Protein	16.523 (S)	0
<i>psbR</i>	R-Protein	10.236 (S)	0
<i>psbS</i>	S-Protein	21.705 (S)	4
<i>psbT</i>	T-Protein	3.283 (S)	0
<i>psbV*</i>	V-Protein	15.121 (Sy)	0
<i>psbW</i>	W-Protein	5.928 (S)	1
<i>psbX</i>	X-Protein	4.225 (S)	1
<i>lhcb4</i>	Lhcb4 (CP29)	29.000	3
<i>lhcb5</i>	Lhcb5 (CP26)	26.000	3
<i>lhcb6</i>	Lhcb6 (CP24)	24.000	3
<i>psbJ</i>	J-Protein	4.116 (P)	1
<i>psbU*</i>	U-Protein	10.000 (Cy)	unbekannt
<i>lhcb1</i>	Lhcb1	25.000	3
<i>lhcb2</i>	Lhcb2	25.000	3
<i>lhcb3</i>	Lhcb3	25.000	3



Tab. 1.1: Übersicht über die Untereinheiten des Photosystems II. 23 PS-II-Proteine werden von den Genen *psbA-psbX* kodiert. Die sechs äußeren Antennen-Komponenten werden von den *Lhcb1-Lhcb6* Genen kodiert. Die Untereinheiten sind sortiert nach den Komplexen, mit denen sie sich aufreinen lassen. Die mit * markierten Untereinheiten sind bisher nur in Cyanobakterien gefunden worden. Die Molekulargewichte der ausgereiften *PsbA-PsbX*-Proteine wurden von den Proteinsequenzen aus der SWISSPROT-Datenbank berechnet. Die Abkürzungen in Klammern hinter den Molekulargewichten geben den Organismus an, für den die molekulare Masse der Untereinheit angegeben ist. S = Spinat, Sy = *Synechococcus* sp., P = Erbse, Ta = Tabak. Für die Lhcb-Proteine und *psbU* sind nur die ungefähren Molekülmassen angegeben. Quelle: Hankamer *et al.*, 1997b.

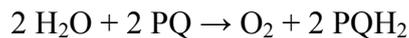
Verschiedene Typen von PS-II-Komplexen sind in der Literatur beschrieben worden, von denen jeder verschiedene Proteinzusammensetzungen und eine verschiedene PS-II-Aktivität aufzeigte (Bassi *et al.*, 1985; Ikeuchi *et al.*, 1985; Barber *et al.*, 1987 und 1997; Nanba und Satoh, 1987; Ghanotakis und Yocum, 1986; Nixon *et al.*, 1986; Ghanotakis *et al.*, 1987; Yamada *et al.*, 1987; Bowlby *et al.*, 1988; Barbato *et al.*, 1995; Hankamer *et al.*, 1997a und 1997b).

Das D1-Protein bildet zusammen mit dem D2-Protein, der α - und β -Untereinheit des Cytochroms *b-559* und dem Protein I das PS-II-Reaktionszentrum (PS-II-RC) (s. Tab. 1.1). Für isolierte PS-II-Reaktionszentren konnten molekulare Massen von 180 kDa ermittelt werden (Zheleva *et al.*, 1996). Zusammen mit den in Tabelle 1.1 angegebenen Untereinheiten bildet das Reaktionszentrum den so genannten PS-II-Core-Komplex. Dieser besitzt ein Molekulargewicht von 236 kDa (Hankamer *et al.*, 1997a). Zusammen mit den Light-harvesting-complex-II-Proteinen, Lhcb 1-6, und dem J- und U-Protein bildet der PS-II-Core-Komplex das komplette Photosystem II mit dem Antennenkomplex (s. Tab. 1.1) mit einer bisher angenommenen molekularen Masse von mehr als 600 kDa (Rhee *et al.*, 1998). Bisher geht man davon aus, dass das Photosystem II in einer dimeren Form in den zusammengestapelten Granathylakoiden vorliegt (Hankamer *et al.*, 1997a; Boekema *et al.*, 1995).

In den letzten Jahren gelang es, die strukturelle Anordnung der Untereinheiten des Photosystems II über elektronenmikroskopische Untersuchungen (Elektronenkristallographie und Kryoelektronenmikroskopie) und Röntgenstruktur-Analysen aufzuklären. Informationen über die Struktur eines PS-II-Sub-Core-Komplexes aus Spinat, bestehend aus dem Reaktionszentrum und CP47, konnten von Rhee *et al.* (1997) durch elektronenkristallographische Analysen von zweidimensionalen Kristallen bei 8 Å gewonnen werden. 1998 bestimmten Rhee *et al.* die dreidimensionale Struktur eines PS-II-Subkomplexes aus Spinat, bestehend aus dem D1- und D2-Protein, CP47 und Cytochrom *b-559*, über Elektronenkristallographie bei 8 Å. Nield *et al.* (2000) klärten den ersten dreidimensionalen strukturellen Aufbau eines PS-II-Superkomplexes über Kryoelektronenmikroskopie bei einer Auflösung von 10-24 Å auf. Dieser Superkomplex bestand aus dem D1- und D2-Protein, CP43, CP47, einem Trimer des Light-harvesting-Komplexes, CP26, CP29 und den drei extrinsischen, luminal gebundenen Hauptproteinen des Oxygen-evolving-Komplexes (33 kDa, 23 kDa und 17 kDa Proteine). Hankamer *et al.* (2001) bestimmten die dreidimensionale Struktur des Photosystem-II-Core-Dimers von höheren

Pflanzen (Spinat) durch Elektronenkristallographie bei einer Auflösung von ca. 1 Å und verfeinerten damit den bisherigen Kenntnisstand über den Aufbau des Photosystems II.

Abbildung 1.1 zeigt die Zusammensetzung der Untereinheiten im Photosystem II sowie seiner Antennensysteme und gibt vereinfacht die photochemischen Prozesse, die von diesem Photosystem katalysiert werden, wieder. Die Summengleichung der gesamten Reaktionen, die von dem Photosystem II betrieben werden, gibt folgende Formel wieder:



PQ = Plastochinon

Alle Kofaktoren, die für diese Reaktion gebraucht werden, sind entweder an die Reaktionszentrum-Proteine D1 und D2 gebunden oder nah mit ihnen assoziiert. Die Lichtenergie, die für die Reaktionen der Wasser-Plastochinon-Oxidoreduktase (Photosystem II) gebraucht wird, wird durch eine große Anzahl an Chlorophyll a- und Chlorophyll b-Molekülen (ca. 250 pro Reaktionszentrum) und Carotinoiden, die mit den Light-harvesting-complex-Antennen-Proteinen Lhcb1-6 assoziiert sind, eingefangen. Die Anregungsenergie wird von den Lhcb-Proteinen entlang eines Netzwerkes von Chlorophyllmolekülen, die mit den Proteinen CP47 und CP43 assoziiert sind, zum PS-II-Reaktionszentrum weitergeleitet. Das PS-II-Reaktionszentrum wird hauptsächlich durch das D1- und D2-Protein gebildet. Diese beiden Proteine sind hochkonserviert zwischen den Spezies der höheren Pflanzen und haben einen signifikanten Grad an Homologie mit der Primärsequenz der L- und M-Untereinheit der Purpurbakterien. Schließlich wird die Anregungsenergie des Lichtes verwendet, um den primären Elektronendonator des Photosystems II P680 zum Radikalkation P680^+ umzuwandeln. P680 wird bisher als ein spezielles Chlorophyllpaar angenommen, das mit dem D1- und D2-Protein verbunden ist. Es weist als oxidiertes Radikal P680^+ ein Redoxpotential von mehr als 1,1 eV auf. Der erste stabile Elektronenakzeptor ist Phäophytin (Phä). Angeregtes P680^* überträgt innerhalb von Picosekunden ein einzelnes Elektron auf Phäophytin, ein chlorophyllartiges Hilfspigment, dem Mg^{2+} fehlt. Durch die Abgabe des Elektrons wird P680^* in das Radikalkation P680^+ umgewandelt. Somit verursacht die Anregung durch die Bildung von Phä^- und P680^+ eine Ladungstrennung. Das sogenannte Radikalpaar $\text{P680}^+\text{Phä}^-$ hat ein elektrochemisches Potential von ca. 1,7 eV. Dies stellt eine effiziente Umwandlung der Photonenenergie bei einer Anregung von 680 nm (1,8 eV) dar (Hankamer *et al.*, 1997b). Um in den Grundzustand zurückkehren zu können, und um für das Einfangen eines weiteren Photons zur Verfügung zu stehen, muss P680^+ ein Elektron

aufnehmen. Dieses Elektron erhält das $P680^+$ von einem speziellen Aminosäurerest des D1-Proteins (D1-Tyr161 = Y_Z) und wird dabei zum Grundzustand $P680$ reduziert. Während der Abgabe des Elektrons von D1-Tyr161 an $P680^+$ füllt das D1-Tyr161 seine Elektronenlücke mit einem Elektron von Wasser über ein Cluster von vier Mangan-Atomen (Mn) auf, der im sogenannten Oxygen-evolving complex (OEC) integriert ist. Dieser Mn-Cluster ist mit der luminalen Oberfläche des PS II assoziiert. Ein vierstufiger Prozess von vier Ein-Elektronen-Übertragungen auf das D1-Tyr161, die jeweils der Absorption eines Photons entsprechen, erzeugen im Mn-Komplex eine Oxidationsstufe von +4. In dieser Oxidationsstufe kann der Mn-Komplex von zwei Wassermolekülen vier Elektronen aufnehmen. Dabei werden $4 H^+$ und O_2 freigesetzt. Dieser Mn-Cluster dient als Ladungsakkumulator, der die Bildung von Sauerstoff ohne die Erzeugung gefährlicher, teilweise reduzierender Zwischenprodukte ermöglicht. Der Oxygen-evolving complex wird vom Mn-Cluster sowie den extrinsischen Proteinen der Genprodukte der Gene *psbO* (33-kDa-Untereinheit), *psbP* (23-kDa-Untereinheit) und *psbQ* (16-kDa-Untereinheit) gebildet. Die 33-kDa-Untereinheit stabilisiert den Mn-Cluster, während die 23-kDa-Untereinheit dem PS II erlaubt, Sauerstoff unter Ca^{2+} - und Cl^- -limitierenden Bedingungen zu entwickeln. Für die 23-kDa-Untereinheit wird die Funktion eines Konzentrators für diese Ionen angenommen. Das 16-kDa-Polypeptid hilft dem PS II bei einer effizienten Sauerstoffentwicklung unter Cl^- -limitierenden Bedingungen (Hankamer *et al.*, 1997b).

Im folgenden Elektronenfluss wird das Elektron, das vom reduzierten Phäophytin aufgenommen wurde, entlang einer Elektronentransportkette weitergeleitet (s. Abb. 1.1). Dabei wird das Elektron vom reduzierten Phäophytin zuerst auf ein Plastochinon-Molekül Q_A übertragen. Dieser Kofaktor ist fest an das D2-Protein gebunden und funktioniert als ein Ein-Elektronen-Carrier. Q_A^- gibt sein Elektron an ein zweites Plastochinon-Molekül (Q_B) ab, das in der Q_B -Bindenische des D1-Proteins assoziiert ist. Dieser Elektronentransfer wird durch ein nicht-Häm-Eisen-Molekül unterstützt, das zwischen Q_A und Q_B liegt (Hankamer *et al.*, 1997b). Die beiden Plastochinone sind über ein nicht-Häm-Eisen-Molekül miteinander verbunden (Oettmeier, 1999). Jedes Plastochinon Q_B kann zwei Elektronen und zwei Protonen aus dem Stroma aufnehmen (Übergang vom Ein-Elektronen-Carrier zum Zwei-Elektronen-Carrier), bevor es in der vollständig reduzierten Form QH_2 (Plastochinol) vom D1-Protein abdissoziiert und in die Lipidmatrix der Thylakoidmembran diffundiert. Das an die Q_B -Bindenische gebundene Plastochinon braucht dazu eine strukturelle Reorientierung für die Reduktion zu Semiplastochinon (Garbers *et al.*, 1998). Schließlich werden die Elektronen von Plastochinol (QH_2) über eine Kette von membrangebundenen Carriern über den

Cytochrom-*b₆f*-Komplex und das Photosystem I an Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP⁺) abgegeben. Dieses wird dadurch zu NADPH unter Freisetzung von H⁺ reduziert (Hankamer *et al.*, 1997b).

Die PS-II-Herbizide, wie z. B. Diuron, konkurrieren mit Q_B um die Q_B-Bindungsstelle am D1-Protein und blockieren so die photosynthetische Elektronenübertragung, wodurch es zu einer Inhibierung der photosynthetischen Elektronentransportkette kommt (Lehninger *et al.*, 1994; Hankamer *et al.*, 1997b).

Die elektronenkristallographische Untersuchung der dreidimensionalen Struktur des Photosystems II bei einer Auflösung von 8 Å von Rhee *et al.* (1998) konnte eine nahe evolutionäre Verbindung zwischen dem Photosystem II von Pflanzen, Algen und Cyanobakterien zu dem Reaktionszentrum von Purpurbakterien finden. Daraus konnten sie schließen, dass die Anordnung der zwei Reaktionszentren in Fünfer-Helices größtenteils unverändert geblieben sein muss, seit sich die Photosynthese vor 3,5 Milliarden Jahren entwickelt hat.

1.2 D1-Protein – die biologische Einheit des Biosensors

Das erste Protein des Photosystems II dessen Funktion eindeutig identifiziert werden konnte, war das so genannte Herbizidbindeprotein, das später als D1-Protein bekannt wurde. Der Name D1-Protein resultiert aus seiner „diffusen“ Anfärbung in der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis = SDS-PAGE) durch Coomassie®-Blau. Pfister *et al.* fanden 1981 durch Photoaffinitätsmarkierungen mit Azidoatrazin ein 32 kDa großes Protein aus der Thylakoidmembran kovalent mit dem Atrazinderivat markiert. Über die Trypsinempfindlichkeit dieses Proteins konnte es als identisch mit dem von Renger (1976) gefundenen „Proteinschild“ über dem Photosystem II und mit dem von Mattoo *et al.* (1981) untersuchten so genannten „rapid-turnover“-Protein des Photosystems II identifiziert werden. Durch diese Zusammenhänge wurde die Bedeutung des bereits als D1-Protein benannten Proteins als Herbizid(binde)protein deutlich.

Velthuys (1981) stellte erstmalig heraus, dass die Reduktion von Plastochinon Q_B durch Plastochinon Q_A (s. Abschn. 1.1) durch Herbizide vom Typ des Diurons und Atrazins verhindert wird. Bowyer *et al.* (1991) fanden heraus, dass die Unterbindung der Reduktion des Plastochinons Q_B durch die Verdrängung des Plastochinons aus seiner Q_B-Bindenische erfolgt. Wegen dieses Wirkungsmechanismus der Herbizide, der Verdrängung von Plastochinon Q_B, wurde das Herbizidbindeprotein D1 funktionell als Q_B-Bindeprotein im

Photosynthesemechanismus erkannt. Erst später wurde klar, dass das D1-Protein noch weitere funktionelle Gruppen trägt und Teil des Reaktionszentrums des Photosystems II ist (Trebst, 1986; Nanba und Satoh, 1987). Aufgrund dessen hat das D1-Protein inzwischen verschiedene Namen, die seine unterschiedlichen Eigenschaften herausstellen: „rapid-turnover“-Protein, Reaktionszentrenpolypeptid, Q_B -Bindeprotein, Herbizid(binde)protein und *psbA*-Gen-Produkt.

Das im Chloroplastengenom liegende Gen, welches das D1-Protein codiert, erhielt als das erste im Photosystem II identifizierte Gen die Bezeichnung *psbA* (*ps* = Photosystem, *b* = II, *A* = erstes identifiziertes Gen). Zurawski *et al.* war es 1982 erstmalig möglich, die *psbA*-Gene von Spinat und Tabak zu sequenzieren. Über die DNA-Sequenz konnte die Aminosäuresequenz ermittelt und damit schon sehr früh das exakte Molekulargewicht für das D1-Protein berechnet werden. Zurawski *et al.* (1982) bestimmten damals ein Molekulargewicht von 38.950 Da für das D1-Protein von Spinat (*Spinacea oleracea*). Das D1-Protein wurde aber trotzdem in der Literatur bis heute immer wieder als 32-kDa-Protein bezeichnet, da es in der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) meistens auf der Höhe von ca. 32 kDa zu finden ist. Das D1-Protein von z. B. Erbse (*Pisum sativum*) besitzt 352 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 38.819 Da (P06585 PSBA_PEA, 2006). Bis heute ist das *psbA*-Gen zahlreicher höherer Pflanzen, Grünalgen und Cyanobakterien sequenziert worden (Svensson *et al.*, 1991; Jansson und Mäenpää, 1997). Die Aminosäuresequenz des D1-Proteins ist zu ca. 80 % zwischen so verschiedenen Organismen wie den höheren Pflanzen und den Cyanobakterien konserviert (Svensson *et al.*, 1991; Jansson u. Mäenpää, 1997). Die Abweichungen in der Aminosäuresequenz sind auf wenige Bereiche in der Sequenz beschränkt. Den höchsten Grad der Konservierung findet man im zentralen helikalen Kern des D1-Proteins, der als die Region für die primäre Ladungstrennungsreaktion betrachtet wird (Michel *et al.*, 1986; Trebst, 1986; Svensson *et al.*, 1990; Andersson und Styring, 1991). Im Besonderen die Transmembran-Helix IV und die III-IV-Helix, die parallel zur Thylakoidmembran auf der luminalen Seite liegt (s. Abb. 1.2), sind beinahe vollständig konserviert (Svensson *et al.*, 1991). Die Q_B -Bindenische, die im stromalen IV-V-Loop des D1-Proteins gelegen ist (s. Abb. 1.2), ist dagegen weniger hoch konserviert und zeigt größere Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies (Sinning *et al.*, 1989; Svensson *et al.*, 1991; Jansson und Mäenpää, 1997; Oettmeier, 1999). Das primäre Translationsprodukt der mRNA des *psbA*-Gens wird prozessiert. Das N-terminale Methionin wird abgespalten, so dass die Aminosäuresequenz immer mit der zweiten Aminosäure, dem Threonin, beginnt. In den meisten Organismen wird dieses Threonin phosphoryliert und acetyliert, wodurch der N-

Terminus blockiert wird (Michel *et al.*, 1988). Zusätzlich wird auch der C-Terminus prozessiert. Die Länge des Abspaltungsstückes schwankt dabei zwischen den verschiedenen Organismen von 0 Aminosäuren (AS) bei Euglena, über 9 AS bei Spinat (Sharma *et al.*, 1997b), bis zu 12 AS bei Cyanobakterien (Trebst, 1995). Der C-Terminus aller D1-Proteine endet nach der Prozessierung bei allen Organismen mit einem Alanin. Nach der N- und C-terminalen Modifikation besitzt das D1-Protein eine molekulare Masse von 38 kDa mit leichten Abwandlungen abhängig von der Spezies.

Erste Arbeiten zur Aufklärung der Struktur des D1-Proteins wurden über Röntgenstrukturanalysen des bakteriellen Photosynthese-Reaktionszentrums von *Rhodospseudomonas viridis* durch Deisenhofer und Mitarbeiter (Deisenhofer *et al.* 1984 und 1985; Deisenhofer und Michel, 1989) ermöglicht. Über weitgehende Sequenzhomologien zwischen dem bakteriellen Photosynthese-Reaktionszentrum und dem pflanzlichen Photosystem II war es damit zu diesem Zeitpunkt auch schon möglich, auf die strukturelle Anordnung des D1-Proteins zu schliessen (Deisenhofer *et al.*, 1984 und 1985; Williams *et al.*, 1984; Trebst, 1986; Michel und Deisenhofer, 1988; Hansson und Wydrzynski, 1990; Diner *et al.*, 1991).

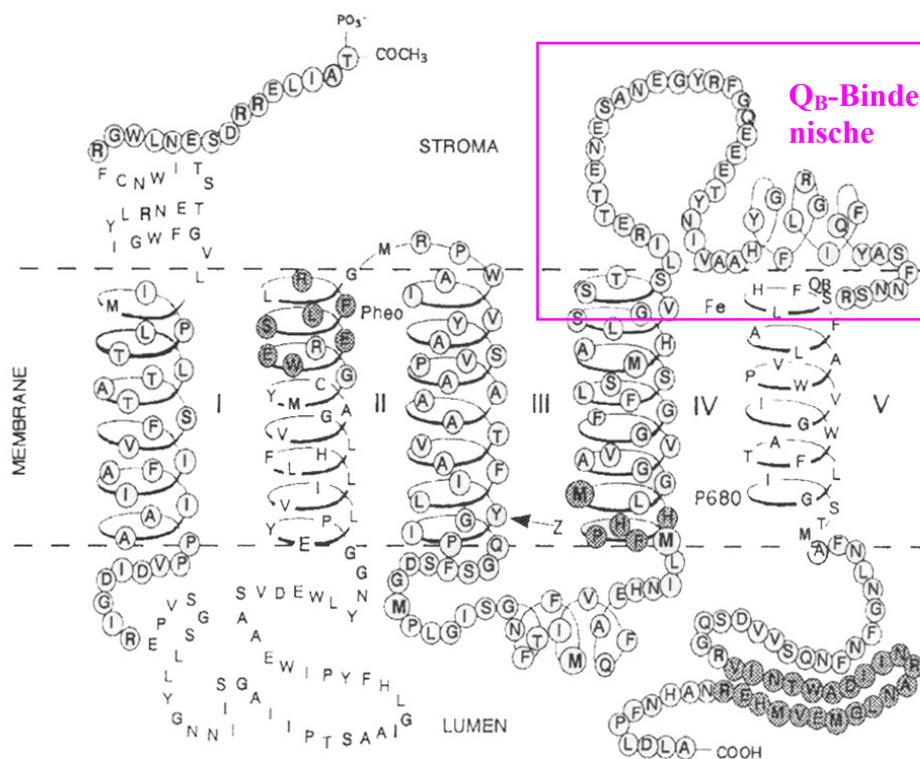


Abb. 1.2: Struktur des D1-Proteins in der Thylakoidmembran. Quelle: Barber, 1998.

Rhee *et al.* (1997) klärten an 2D-Kristallen von PS-II-Subkomplexen (s. Abschn. 1.1) aus Spinat über Kryoelektronenmikroskopie 1997 zum ersten Mal die zweidimensionale Organisation des Photosystems II und die Anordnung des pflanzlichen D1-Proteins in Form von Transmembran-Helices auf. 1998 bestimmten sie die dreidimensionale Struktur dieses PS-II-Subkomplexes und damit auch die Anordnung des D1- sowie des D2-Proteins in die Thylakoidmembran-durchspannenden α -Helices (Rhee *et al.*, 1998). Sie stellten für das D1- wie auch das D2-Protein jeweils eine Anordnung in 5 Transmembran-Helices (I-V) fest, die an einer Pseudo-Zweifach-Achse angeordnet waren, in einer Konformation ähnlich der L- und M-Untereinheit des Reaktionszentrums von Purpurbakterien (Michel und Deisenhofer, 1988). Die erhaltenen Strukturdaten stimmten mit den Voraussagen aus den Sequenzhomologiestudien überein (Williams *et al.*, 1984).

Die Struktur des D1-Proteins besteht damit aus 5 Transmembran-Helices (I-V), die in die Thylakoidmembran der Chloroplasten eingebettet sind, und zwei Oberflächen-Helices (Loops) zwischen den Transmembran-Helices III und IV (auf der luminalen Seite) sowie IV und V (auf der stromalen Seite) (s. Abb. 1.2) (Barber *et al.*, 1997).

Das D1-Protein ist damit wie das D2-Protein ein sehr hydrophobes Protein. Das D1-Protein bindet den Großteil der Kofaktoren, die in den PS II vermittelten Elektronentransport eingebunden sind: Tyr161 (Y_Z); P680 wahrscheinlich über His198; Phäophytin vermutlich über Tyr126, Tyr147, Ala150 und Glu130; Q_B über Interaktionen mit Tyr254, Phe255, Gly256 und andere Aminosäuren; den Mn-Cluster wahrscheinlich über Asp170, Glu189, Gln165, Ala344, His109, His332 und His377 und das nicht-Häm-Eisen-Molekül höchstwahrscheinlich über His215 und His272 (Debus, 1992; Michel und Deisenhofer, 1988; Hankamer *et al.*, 1997b).

Eine wichtige Eigenschaft des D1-Proteins ist die leichte Schädigung durch Photooxidation und der schnelle Ersatz des geschädigten Proteins durch ein neu synthetisiertes D1-Protein („rapidly turning over protein“) (Mattoo *et al.*, 1984; Barber und Andersson, 1992). Der Abbau, die Synthese und der Wiedereinbau von neu synthetisiertem D1-Protein in den Photosystem-II-Komplex stellt einen sehr interessanten Aspekt der Dynamik des Photosystems II dar und wurde ausführlich untersucht (Aro *et al.*, 1993; Andersson und Aro, 1997; Lindahl *et al.*, 2000; Haußühl *et al.*, 2001).

1.3 Q_B -Bindenische des D1-Proteins - Bindung von PS-II-Herbiziden an die Q_B -Bindenische

Die Lage der Q_B -Bindenische konnte durch die Untersuchung von herbizidtoleranten Pflanzen und nach Photoaffinitätsmarkierungen bestimmt werden (s. Abb. 1.2) (Oettmeier, 1999).

Die Q_B -Bindenische des D1-Proteins konnte damit im Bereich der Aminosäuren 211 (Phe) bis 275 (Leu) der Aminosäuresequenz des D1-Proteins identifiziert werden und besteht damit aus 65 AS (Vermaas und Arntzen, 1983; Vermaas *et al.*, 1983; Carpenter und Vermaas, 1989; Giardi *et al.*, 1992; Trebst, 1995; Jansson und Mäenpää, 1997). Sie beinhaltet einen Teil der Transmembran-Helix IV, die stromale parallele Helix IV-V und einen Teil der Transmembran-Helix V (s. Abb. 1.2) (Oettmeier, 1999).

Es war schon früh bekannt, dass das Plastochinon in einer anderen Art und Weise an die Q_B -Bindenische des D1-Proteins bindet als die Photosystem-II-Herbizide, die so genannt werden, da sie ihre Wirkung durch Inhibierung des PS II entfalten (Vermaas und Arntzen 1983; Vermaas *et al.*, 1983). Herbizide, die am Photosystem II angreifen, inhibieren, indem sie mit dem nativen Plastochinon um die Q_B -Bindestelle konkurrieren und dabei das Plastochinon von der Q_B -Bindenische verdrängen, da sie eine höhere Affinität zur Q_B -Bindenische besitzen als das Plastochinon (Oettmeier, 1999). Die Photosystem II-Herbizide binden dabei nicht-kovalent an die Q_B -Bindenische des D1-Proteins (s. Abb. 1.3) und können ihrerseits kompetitiv aus dieser Bindungsstelle durch Analoga der Verbindungen des Harnstoff-/Triazintyps oder nicht kompetitiv durch Phenolhemmstoffe verdrängt werden (Vermaas *et al.*, 1983; Ohki *et al.*, 1999).

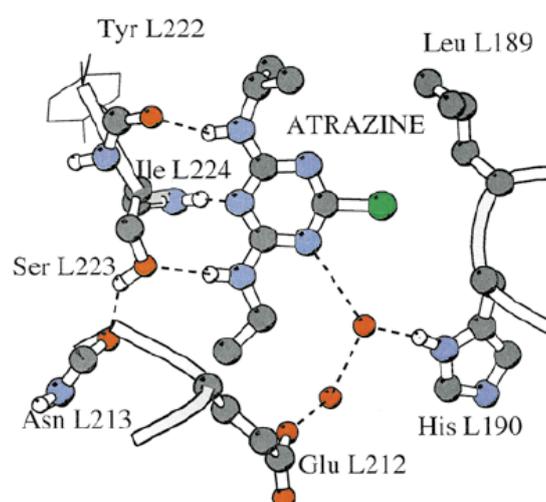


Abb. 1.3: Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Atrazin und der Q_B -Bindenische des Reaktionszentrums von *Rhodospseudomonas viridis*. C-Atome: grau, N-Atome: blau, O-Atome: rot, Cl-Atom: grün, H-Atome: weiß. Die vom pflanzlichen Photosystem II abweichenden Atrazin-bindenden Aminosäuren, sind durch die unterschiedlichen Aminosäuresequenzen der Q_B -Bindenische von Pflanzen und Purpurbakterien bedingt. Quelle: Lancaster und Michel, 1999.

Die Bindungsaffinität von Herbiziden zur Q_B -Bindenische ist dabei abhängig von der Aminosäurezusammensetzung des stromalen hydrophilen Loops zwischen den Transmembran-Helices IV und V des D1-Proteins (s. Abb. 1.2) (Oettmeier, 1999).

Ist die Q_B -Bindenische durch ein PS-II-Herbizid besetzt, kommt der Elektronentransport im Reaktionszentrum des Photosystems II sofort zum Erliegen (Trebst, 1995). Der lineare Elektronentransport zum Cytochrom-*b₆/f*-Komplex wird unterbrochen und reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH), das für die Reduktion des Kohlenstoffdioxides essentiell ist, kann nicht synthetisiert werden. Hierdurch ausgelöste sekundäre Reaktionen führen zur Zerstörung des Photosyntheseapparates (Trebst, 1995).

Für die Orientierung der Herbizide in der Q_B -Bindungsnische sind folgende Aminosäuren besonders wichtig (s. Abb. 1.4): Phe211, Leu218, Val219, Ala251, Phe255, Ser264 und Leu275 (Oettmeier, 1999). Die wichtigste Mutation und die einzige, die bei höheren Pflanzen *in vivo* vorkommt, ist die Mutation von Ser264 zu Gly. Der Verlust der Hydroxymethylgruppe in Ser264 durch den Austausch zu Gly führt zu drastischen Effekten in der Triazin-Bindung. Die Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Alkylaminogruppe des Triazins und der Hydroxymethylgruppe des original vorliegenden Serins geht verloren, was eine stark verminderte Bindungsaffinität von Triazinen bewirkt (Oettmeier, 1999).

Zusätzlich vermindert die Substitution von Ser264 durch Gly auch die Elektronentransferrate zwischen Q_A und Q_B . Darüber hinaus ist die Gleichgewichtskonstante $Q_A \rightarrow Q_B$ geringer und die Quantenausbeute der Photosynthese wird bei der Mutante um ca. 23% verringert. Die Anzahl der aktiven Photosystem-II-Reaktionszentren wird um ca. 25% herabgesetzt. Die mutierte Pflanze ist damit anfälliger gegen Photoinhibierung und sensitiver gegenüber Hitze. (Arntzen *et al.*, 1979; Ort *et al.*, 1983; Ireland *et al.*, 1988; Jursinic und Percy, 1988; Dekker und Sharkey, 1992).

Durch gezielte, induzierte Mutagenese ließen sich auch andere Mutationen in der Region von Phe211 bis Leu275 hervorrufen, womit die Lage der Q_B -Bindenische in der Polypeptidkette des D1-Proteins identifiziert werden konnte. Einige Beispiele sind: Die Mutation von Phe211 zu Ser, die eine Resistenz gegen Atrazin, Diuron und Metribuzin hervorruft; eine Mutation von Val219 zu Ile, die zu einer Resistenz gegen Diuron und zu einer Resistenz oder Supersensitivität gegen 30 Triazinone führt (Oettmeier *et al.*, 1991); der Austausch von Phe255 zu Tyr, der eine Atrazin-resistente Mutante verursacht sowie die Mutation von Leu275 zu Phe, die eine Resistenz zu z. B. Bromacil, Diuron and Metribuzin bewirkt (Oettmeier, 1999).

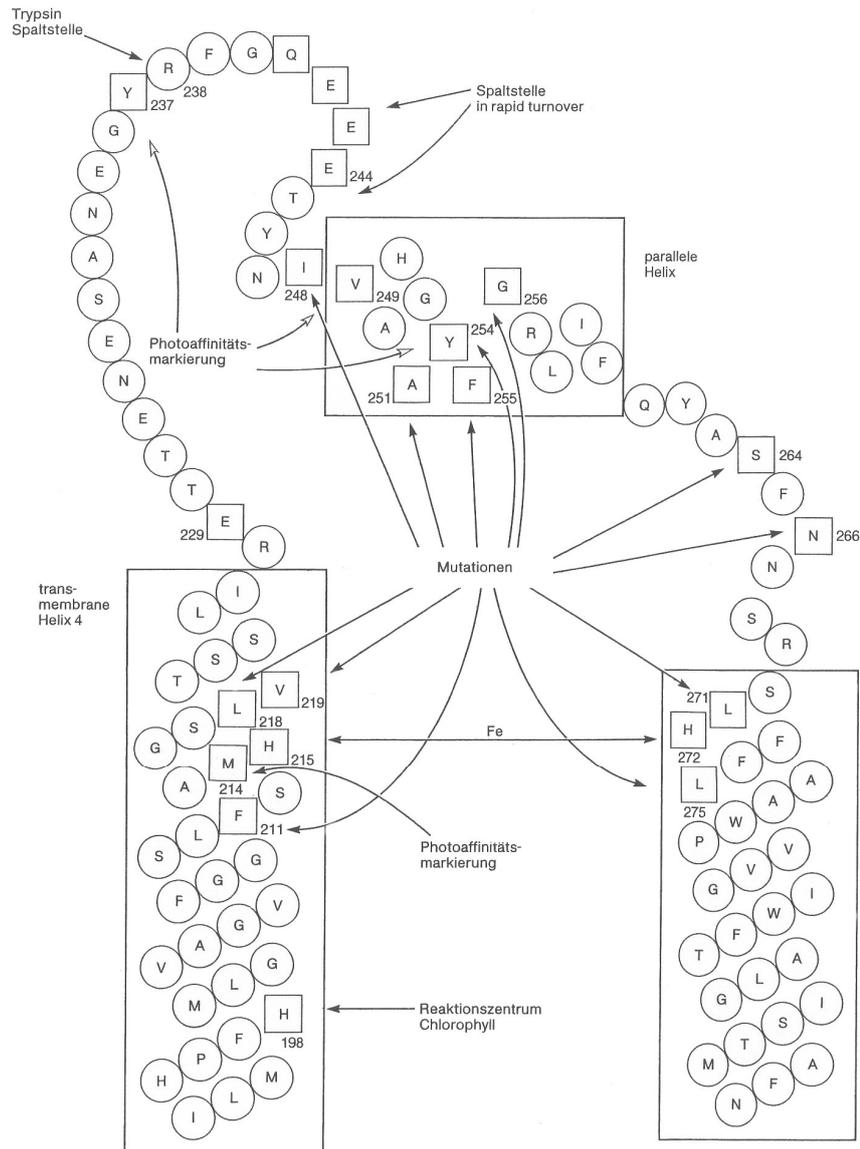


Abb. 1.4: Aminosäuresequenz der Herbizidbinderegion des D1-Proteins. In den Kästen sind Sequenzstücke angegeben, die in den zwei transmembranen Helices IV und V bzw. in der membranparallelen Helix zwischen IV und V angeordnet sind. Die Pfeile bzw. Quadrate zeigen die Aminosäuren an, die nach Mutantanalysen oder Photoaffinitätsmarkierung als Herbizidbinderegionen identifiziert wurden. An den mit Mutation bezeichneten AS liegen das Plastochinon bzw. die Herbizide. Die Spaltstelle beim Abbau des D1-Proteins, induziert durch Photooxidation, wird in der Nähe der Glutaminsäure 243 vermutet. Die Trypsinempfindlichkeit des D1-Proteins wird durch die leichte Zugänglichkeit des Arginin 238 verursacht. Die Histidine 215 und 272 sind an der Bindung eines Fe-Atoms und das Histidin 198 an der Bindung des Reaktionszentrumschlorophyllpaar P680 beteiligt. Quelle: Trebst, 1995.

Es konnte gezeigt werden, dass jedes Herbizid eine eigene Position in der Q_B -Bindenische einnimmt und die Wechselwirkungen mit einzelnen Aminosäuren der Bindenische eine große Variation zulassen (Oettmeier *et al.*, 1982) (s. Abb. 1.4). Dabei gibt es enorme Unterschiede in der Bindung von so genannten „klassischen Herbiziden“ und phenolischen Herbiziden (s. Abschn. 1.4). Obwohl beide Klassen von Herbiziden in ihrem Wirkmechanismus prinzipiell ähnlich sind und das Plastochinon (Q_B) in der Q_B -Bindenische des D1-Proteins ersetzen

(Mattoo *et al.*, 1981; Pfister *et al.*, 1981), interagieren sie mit verschiedenen Aminosäureresten des D1-Proteins (Draber *et al.*, 1991).

Die Phenolherbizide sind im Vergleich zu den „klassischen Herbiziden“ etwas gedreht, wodurch andere Substituenten in den Substanzen und andere Aminosäuren in der Q_B-Bindenische für die hochaffine Bindung wichtig sind. Der Hauptunterschied besteht allerdings in der besonderen Rolle des Serins 264 für die Bindung der „klassischen Herbizide“, das bei der Bindung der Phenolherbizide in einer gänzlich anderen Weise beteiligt ist (Trebst, 1995). Die „klassischen Herbizide“ orientieren sich mit Vorzug gegen das Ser264 und bilden eine Wasserstoffbrückenbindung zur Hydroxymethylgruppe des Serins. Im Gegensatz dazu besitzen die phenolischen Herbizide eine Hydroxylgruppe, die mit der Hydroxymethylgruppe des Serins keine Bindung eingehen kann. Daher werden die phenolischen Herbizide vom Ser264 zu His215 verdrängt (Trebst, 1987). Dabei variieren auch die Bindungsaffinitäten innerhalb einer Gruppe von Verbindungen (Oettmeier, 1999). Das PS-II-Herbizid Atrazin ist z. B. über die Ethylaminoseitenkette mit der Hydroxylseitenkette des Ser264 über eine Wasserstoffbrückenbindung verbunden. Der Stickstoff des aromatischen Rings ist über eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Stickstoff der Rückenkettens-Amidgruppe des Phe265 verknüpft. Zusätzlich befindet sich die Ethylaminoseitenkette des Atrazins nahe dem Ala251. Bei dem Herbizid Metribuzin ist die freie Aminogruppe über Wasserstoffbrückenbindung an die Seitenketten-Hydroxylgruppe des Ser264 gebunden. Die Carbonylgruppe des Metribuzin ist über Wasserstoffbrückenbindung mit dem Stickstoff der Rückenkettens-Amidgruppe der Aminosäure Phe265 assoziiert und der Methylthiosubstituent ist im Kontakt mit der Seitenkette des Ala251 (Tietjen *et al.*, 1990; Oettmeier, 1999).

Das D2-Protein ist nicht weit entfernt von der Q_B-Bindungsnische des D1-Proteins. Daher wird ein Einfluss auf die Konformation des D1-Proteins und/oder eine Beteiligung an der Herbizidbindung vorausgesetzt (Trebst, 1986; Rhee *et al.*, 1997 und 1998; Hankamer *et al.*, 2001).

1.4 Photosystem-II-Herbizide

Heute sind mehr als 30 experimentell bestimmte herbizide Wirkorte in der Pflanze bekannt, von denen etwa 19 wirtschaftlich von Interesse sind. Die meisten der Wirkorte sind im Chloroplasten der Pflanzenzelle lokalisiert. Andere Zellorganellen bzw. -kompartimente (z. B. Zellkern, Cytoplasma, Zellwand) spielen eine weniger wichtige Rolle (Berg *et al.*, 1999). Einer dieser Wirkorte ist die Q_B-Bindenische des Photosystems II; die Herbizide, die

an diesem Wirkort angreifen, nennt man PS-II-Herbizide. Zur Zeit sind ca. 400 Herbizide zugelassen, wobei die PS-II-Herbizide mit ca. 100 Vertretern immer noch die wichtigste Rolle der derzeit kommerziell eingesetzten Herbizide spielen (Eckes *et al.*, 2004). Die PS-II-Herbizide kann man in zehn etablierte Stoffklassen unterteilen (s. Abb. 1.5) (Eckes *et al.*, 2004), dabei gehören sie zu einer Vielzahl von unterschiedlichen chemischen Klassen, wie z. B. den Triazinen, Triazinonen, Harnstoffen, Biscarbamaten, Dinitrophenolen und Cyanophenolen (s. Abb. 1.5). Sie lassen sich grob in zwei große Gruppen einteilen: 1.) die „klassischen Herbizide“ und 2.) die phenolischen Herbizide. Zu den „klassischen Herbiziden“ zählen die Harnstoffderivate, die Uracile, die s-Triazine, die Triazinone, die Anilide und die Biscarbamate. Zu den phenolischen Herbiziden zählen die Nitro- und Cyanophenole, die Hydroxybenzonnitrile, die Ketonitrile und die phenolischen Heterozyklen (s. Abb. 1.5) (Trebst, 1995). Die größte Gruppe von PS-II-Hemmstoffen sind dabei die Harnstoff-Derivate (ca. 40), gefolgt von den s-Triazinen (ca. 25) (Hock *et al.*, 1995a).

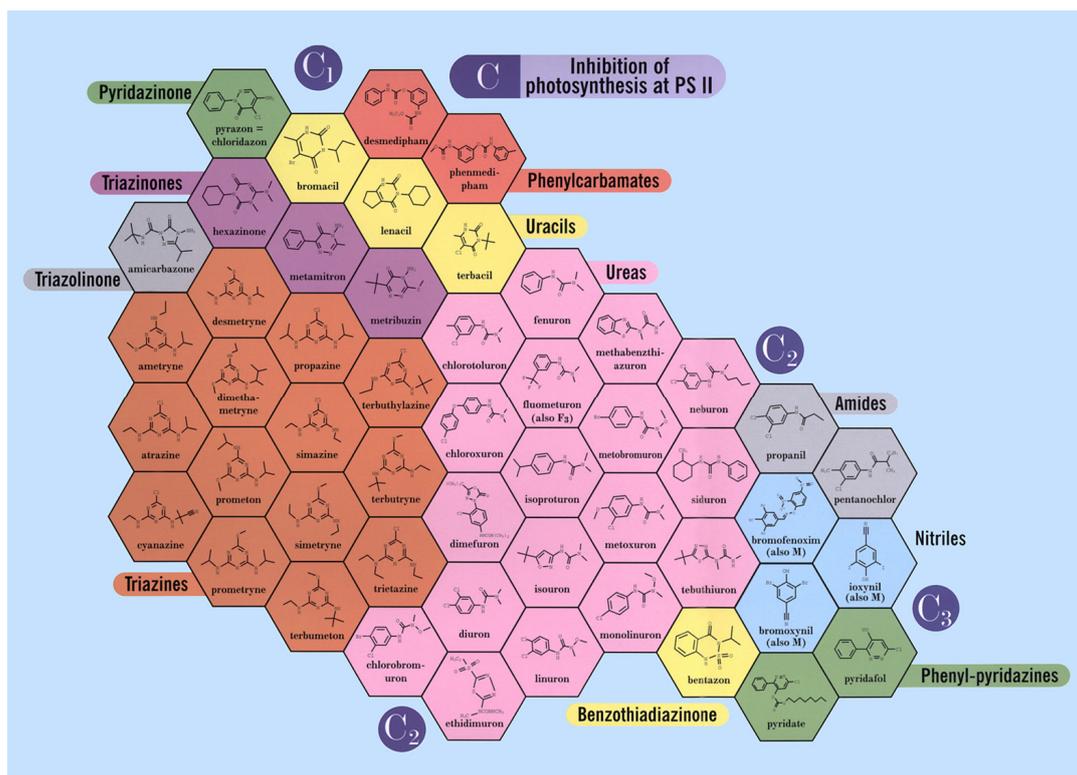


Abb. 1.5: Übersicht über die verschiedenen PS-II-Herbizid-Substanzklassen. Quelle: www.plantprotection.org/hrac bzw. Poster zu bestellen bei: Dr. Peter Boutsalis, SYNGENTA, Jealott's Hill Research Centre, Berkshire RG42 6EY, UK.

Unter den PS-II-Herbiziden ist Atrazin (ein Triazin) das am häufigsten eingesetzte PS-II-Herbizid weltweit (2001 mehr als 60.000 Tonnen) (Seitz *et al.*, 2003). Atrazin ist zwar in Deutschland seit 1992 nicht mehr zugelassen, stellt aber weltweit einen der Hauptwirkstoffe

für Umweltverschmutzungen durch Herbizide dar. Die in dieser Arbeit verwendeten PS-II-Herbizide sind in Tabelle 1.2 mit ihren Strukturformeln aufgeführt.

Atrazin sowie Diuron wurden in dieser Arbeit exemplarisch als PS-II-Herbizide ausgewählt, da sie zu den am besten untersuchten Herbizidwirkstoffen gehören. Diuron ist auch heute noch ein wichtiges Herbizid aus der Harnstoffklasse, das vornehmlich als Total-Herbizid zur Unkrautbekämpfung eingesetzt wird. Metribuzin und das als erstes in den Handel gebrachte Triazin-Herbizid Simazin, wurden in dieser Arbeit als weitere PS-II-Herbizide verwendet, da mit ihnen sowie mit Atrazin und Diuron in der Arbeitsgruppe große Erfahrungen bezüglich ihrer Hemmwirkung auf den photosynthetischen Elektronentransport von isolierten Chloroplasten-Thylakoidmembranen vorlagen (Bausch-Weis, 1994; Bausch-Weis *et al.*, 1994; Trapmann *et al.*, 1998; Trapmann, 1999; Schnabl *et al.*, 2000; Trapmann *et al.*, 2000; Schnabl und Trapmann, 2001).

PS-II-Herbizid	Substanzklasse	Strukturformel
Atrazin	Triazine	
Simazin	Triazine	
6-{{4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl}amino}-hexansäure = Simazinhexansäure = Simazinderivat	Triazine	
Metribuzin	Triazinone	
Diuron (Di-Chlorophenyl-di-Methyl-Urea = DCMU)	Harnstoffe	

Tab. 1.2: Strukturformeln und Substanzklassen der PS-II-Herbizide und eines Simazinderivats.

1.5 Biosensoren für den Nachweis von ökotoxikologischen Substanzen

Die Umweltüberwachung ist wichtig, um die Intaktheit von Ökosystemen zu garantieren. Die Entwicklung von Biosensoren stellt dabei einen wertvollen Schritt in Richtung der Verbesserung der Schadstoffüberwachung in Ökosystemen dar.

Biosensoren sind analytische Instrumente, die aus einem biologischen Element bestehen, das für Selektivität sorgt, und aus einem physikochemischen Transducer, der die chemischen Signale für die weitere Verarbeitung der Daten in ein elektrisches Signal transferiert. Der Transducer kann optisch, elektrochemisch, thermometrisch, piezoelektrisch oder magnetisch sein (Clark, 1956; Turner *et al.*, 1987; Macholán, 1991; Marty *et al.*, 1995; Turner, 1999).

Eine große Varietät an biologischen Rezeptoren sind in Biosensoren integriert worden, wie z. B. Enzyme, Organellen, intakte Mikroorganismen und Gewebe sowie Antikörper, Zellrezeptoren, Nukleinsäuren und biomimetische Moleküle (Turner, 2000). Biosensoren benutzen das biologische Element, um den gewünschten Analyten zu detektieren, daher wurden und werden Biosensoren eingesetzt, um chemische Schadstoffe zu quantifizieren. Ein anderes wichtiges Merkmal von Biosensoren ist die Fähigkeit, eine Klasse von Verbindungen und nicht nur eine einzige Chemikalie messen zu können. Dieser so genannte Summenparameter schließt Effekte wie Toxizität (Farre *et al.*, 2001), Karzinogenität, Mutagenität, Cytotoxizität (Castillo *et al.*, 2001) und Genotoxizität (Billinton *et al.*, 1998; Polyak *et al.*, 2000 und 2001) mit ein, die mit konventionellen chemischen Analysemethoden nicht zu charakterisieren sind. Obwohl mit Biosensoren meistens eine ganze Klasse an Schadstoffen gemessen wird, können einige Biosensoren aber auch einen hohen Grad an Spezifität liefern. Ein Biosensor wird so entwickelt, dass er eine spezielle analytische Aufgabe erfüllt, wobei er je nach der verwendeten biologischen Einheit sowohl einen einzelnen Analyten als auch eine Gruppe von Analyten in einem Medium messen kann (Kröger *et al.*, 2002). Die starke Nähe des biologischen Elements zum Transducer führt aufgrund der geringen Diffusionszeiten zu schnellen Messungen. Das bedeutet, dass automatische Biosensoren einen hohen Probendurchsatz haben können und dass einzelne Messungen in Echtzeit durchführbar sind.

Die klassischen chemischen Analysemethoden zur Schadstoffüberwachung, wie z. B. Gaschromatographie, High-Performance-Liquid-Chromatographie und Massenspektrometrie, sind sensitive und effektive Verfahren. Biosensoren haben ihnen gegenüber jedoch den Vorteil, dass sie den tatsächlichen physiologischen Einfluss von aktiven Verbindungen in der Probe wiedergeben können, da selbst geringe Konzentrationen von Schadstoffen die lebenden

Organismen bzw. biologischen Einheiten beeinflussen, indem sie ihre physiologischen Prozesse stören. Daher ist eine biologische Komponente essentiell für Biosensoren, die darauf abzielen, den generellen Status eines Ökosystems zu ermitteln (Yatsenko, 1996). Zusätzlich ist es mit einem Biosensor über den wirkungsbezogenen Mechanismus an der biologischen Einheit auch möglich, unbekannte Schadstoffe zu erfassen, wie unter Umständen noch stärker toxisch wirkende und noch nicht identifizierte Abbauprodukte von Schadstoffen (Obst und Brenner-Weiß, 2002).

1.5.1 Biosensoren für den Nachweis von Herbiziden/PS-II-Inhibitoren

In den letzten Jahren sind viele Immunosensoren für die Herbiziddetektion entwickelt worden, die auf Antikörpern basieren (Hock *et al.*, 1995b; Marco *et al.*, 1995; Killard *et al.*, 2000; Mallat *et al.*, 2001a, 2001b und 2001c; Mascini, 2001). Mit ihnen vermag man, abhängig von dem verwendeten Antikörper, eine breite Palette von verschiedenen Herbiziden zu detektieren. Wegen der individuellen Spezifität der Antikörper (Lottspeich und Zorbas, 1998) ist es mit ihnen aber immer nur möglich ein Herbizid oder chemisch nah miteinander verwandte Herbizide nachzuweisen. Daher ist es schwierig, einen auf Antikörpern basierenden Immunosensor für die Herbizidbestimmung in unbekanntem Proben bzw. in Proben, in denen verschiedene Herbizide vorhanden sind, zu verwenden. Aus diesem Grund sind solche Immunosensoren beispielsweise nicht zum Pre-Screening von Gewässerproben geeignet.

Ein zunehmendes Verständnis der Biochemie und Molekularbiologie von photosynthetischen Organismen hat Licht auf die potentiellen Anwendungen von isolierten photosynthetischen Membranstrukturen in der Kontrolle von Umweltschadstoffen geworfen (Giardi *et al.*, 2001). Dazu zählen z. B. Biosensoren, die auf einer biologischen Einheit von Thylakoidmembranen oder Photosystem-II-Proteinkomplexen beruhen. Biosensoren, die als biologisches Erkennungselement eine Einheit der photosynthetischen Membranstruktur verwenden, erlauben dabei die Detektion eines breiten Bereichs von Herbiziden.

Die am häufigsten verwendeten biologischen Messfühler zur Detektion von Photosynthese-Herbiziden benutzen isolierte Thylakoidmembranen und Chloroplasten, intakte Algenzellen oder Cyanobakterien und Diatomeen als biologische Zielstrukturen. Dabei werden entweder Änderungen im photosynthetischen Ablauf (Rawson *et al.*, 1987; Pandard und Rawson, 1993; Preuss und Hall, 1995; Avramescu *et al.*, 1999; Rouillon *et al.*, 1999), die Inhibierung des photosynthetischen Elektronentransports (Rawson *et al.*, 1989; Hagggett, 1994) oder Änderungen in der Chlorophyll-Fluoreszenz (Arsalane *et al.*, 1993; Conrad *et al.*, 1993;

Yoneyama *et al.*, 1993; Bausch-Weis *et al.*, 1994; Heever und Grobbelaar, 1998; Schnabl *et al.*, 2000; Schnabl und Trapmann, 2001) gemessen.

In den 50er Jahren nutzte man für die Auswahl der wirksamsten Herbizide die Tatsache, dass Herbizide die Hill-Reaktion in isolierten Chloroplasten inhibieren können (Wessels und Veen, 1956; Good, 1961). In den 90er Jahren wurden isolierte Chloroplasten sowie Thylakoide vielfältig in Biosensoren zur Herbiziddetektion eingesetzt. Diese Biosensoren testen entweder die Inhibierung der Hill-Reaktion (Loranger und Carpentier, 1994; Rouillon *et al.*, 1994), die Inhibierung der 2,6-Dichlorophenolindophenol(DCPIP)-Photoreduktion (Brewster und Lightfield, 1993; Brewster *et al.*, 1995) oder Änderungen in der Chlorophyll-Fluoreszenz (Conrad *et al.*, 1993; Bausch-Weis *et al.*, 1994; Merz *et al.*, 1996; Schnabl *et al.*, 2000; Schnabl und Trapmann, 2001).

Erste Entwicklungen von Biosensoren auf der Basis von PS-II-Proteinkomplexen sind schon erfolgt (Rao *et al.*, 1990; Jockers *et al.* 1993; Yatsenko, 1996; Koblizek *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 2000 und 2003). Koblizek *et al.* (1998) konnten einen stabilen und sensitiven PS-II-Biosensor herstellen, der auf der biologischen Einheit eines PS-II-Proteinkomplexes aus dem thermophilen Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* basiert. Nakamura *et al.* (2000 und 2003) entwickelten bereits einen Oberflächen-PlasmonResonanz-Biosensor (SPR-Biosensor) mit photosynthetischen Reaktionszentren aus Purpurbakterien, mit dem sie Atrazinkonzentrationen von bis zu 1 µg/ml detektierten. Im Allgemeinen gilt es jedoch noch die Stabilität und die Sensitivität solcher auf Einheiten des Photosystems II basierenden Biosensoren zu verbessern.

Die Sensitivität eines Biosensors hängt sowohl von dem biologischen Rezeptor als auch von der Konzentration der Herbizide, der Probenmatrix und den experimentellen Bedingungen (z. B. pH-Wert, Temperatur) ab. So variiert bei Biosensoren, basierend auf der Inhibierung der Q_B-Bindenische des D1-Proteins, die Nachweisgrenze z. B. für Atrazin von 1 bis 10³ µg/l, abhängig von der biologischen Einheit, die für die Messungen verwendet wurde, wie z. B. Cyanobakterien, einzellige Algen, Chloroplasten, Thylakoide oder Reaktionszentren bzw. PS-II-Proteinkomplexe (Giardi *et al.*, 2001).

Für die Verwendung von auf Einheiten des Photosystems II basierenden Biosensoren spricht die Einfachheit der biologischen Transduktion. Sie kann direkt, ohne zusätzliche Marker oder Transducer-Moleküle, aufgenommen werden.

Diese Beobachtungen haben ein Interesse für die Entwicklung von biologischen Sensoren initiiert, die mit einer biologischen Einheit aus PS-II-Proteinkomplexen geringe Mengen von Herbiziden in Wasser und Böden detektieren können.

1.5.2 D1-Biosensor

Das D1-Protein ist die Zielstruktur von Herbiziden, die die Photosynthese inhibieren (s. Abschn. 1.2 und 1.3). Die Tatsache, dass die PS-II-Herbizide am D1-Protein angreifen, macht dieses damit zu einem guten analytischen Werkzeug für die Detektion von Herbiziden. Die hohe Bindungsaffinität der PS-II-Herbizide zum D1-Protein (s. Abschn. 1.3) bietet daher eine einzigartige Möglichkeit, das D1-Protein bzw. den PS-II-Proteinkomplex zur Detektion von PS-II-Herbiziden in einem Biosensor einzusetzen.

Erste Interaktionsmessungen zwischen dem D1-Protein und PS-II-Herbiziden sind schon erfolgt (Chegel *et al.*, 1998; Piletskaya *et al.*, 1998 und 1999).

Biosensorsysteme, basierend auf der Bindung von PS-II-Herbiziden an das D1-Protein im Photosystem II von Pflanzen und anderen photosynthetischen Organismen, stellen die direkteste und einfachste Methode für die Herbiziddetektion dar.

Dabei wäre es mit einem derartigen System über das Wirkpotential auf die Photosynthese möglich, neben der Quantifizierung der Schadstoffe gleichzeitig ihren Toxizitätseffekt auf das Ökosystem zu erfassen. Auf der Basis der biologischen Einheit des D1-Proteins oder des PS-II-Proteinkomplexes wäre es damit in Zukunft möglich, einen Biosensor für das schnelle Pre-Screening von Umweltproben auf Photosystem-II-Inhibitoren zu entwickeln. Dieser könnte teure und zeitaufwendige chemische Analysen minimieren oder sogar ersetzen.

1.5.3 Einsatz von Biosensoren in der Umweltüberwachung

Im Allgemeinen können Biosensoren, die in der Umweltanalyse angewandt werden, nicht mit klassischen analytischen Verfahren konkurrieren. Stattdessen werden sie meistens für das Pre-Screening von Umweltproben auf Schadstoffe entwickelt. Wenn notwendig, können die mit Kontaminationen identifizierten Proben detailliert chemisch analysiert werden, um den genauen Schadstoff herauszufinden. Dies kann die Kosten für Überwachungsprogrammen von beispielsweise Gewässern deutlich verringern (Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2004). Wird mit Hilfe eines solchen Pre-Screenings keine Kontamination nachgewiesen, kann die aufwendige und zeitintensive chemische Analytik mit genormten Verfahren auf die Proben mit positivem Nachweis beschränkt werden. Die Anzahl der Proben, die einer weiteren Untersuchung bedürfen, wird so vermindert. Die biosensorischen Untersuchungsmethoden arbeiten zwar meistens nicht so präzise wie klassische Analyseverfahren, werden aber in der Praxis häufig eingesetzt, um sehr schnell erste Aussagen über das Vorhandensein von Umweltschadstoffen in verschiedenen Matrices, z. B. in Wasser und Böden, machen zu können.

Verglichen mit klassischen analytischen Methoden wie z. B. der Gaschromatographie, der High performance liquid chromatography (HPLC) oder der Massenspektrometrie (MS) ist die Detektion von Schadstoffen (z. B. Herbizide) durch Biosensoren, die auf dem PS II basieren, im Allgemeinen weniger spezifisch. Diese Biosensoren können eher wertvolle Informationen über eine Klasse von Schadstoffen als über eine spezifische Verbindung liefern. Sie ermöglichen es daher, die Gesamtheit der auf sie wirkenden phytotoxischen Verbindungen als Summenparameter zu bestimmen.

Giardi *et al.* (2000) entwickelten einen Fluoreszenz-Biosensor, basierend auf isolierten Thylakoiden von Mutanten, die resistent gegen verschiedene Herbizidklassen waren.

Über die Isolation der Photosystem-II-Komplexe bzw. des D1-Proteins dieser Mutanten wäre es zukünftig möglich, zwischen verschiedenen Subklassen von Herbiziden zu unterscheiden und dadurch die Spezifität eines PS-II-basierten Biosensors zu erhöhen.

Biosensoren, die auf dem Photosystem II basieren, liefern wertvolle Informationen über den tatsächlichen biologischen Effekt des Schadstoffes in einer Probe, da die Phytotoxizität über die biologische Wirkung auf die Zielstruktur bestimmt wird. Auf PS-II-Einheiten basierende Biosensoren haben damit das Potential, in der Beurteilung der toxischen Belastung eines Systems und damit in der Umweltüberwachung eingesetzt zu werden, um die Anzahl der komplexen chemischen Analysen zu verringern.

1.6 Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR)

Die Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) ist eine von vielen optischen Techniken, die in Biosensoren verwendet werden. Der Hauptvorteil der SPR gegenüber den meisten anderen optischen Biosensoren ist, dass die Bindung des Analyten direkt, in Echtzeit, ohne die Verwendung von markierten Molekülen („Labelling“) gemessen werden kann. Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Biosensoren sind daher eine etablierte Methode zur Messung von molekularen Interaktionen geworden.

Vom generellen Aufbau her besteht ein SPR-Biosensor aus einem optischen System, einem umwandelnden Medium (Transducer), welches das optische und biochemische Element miteinander verbindet, und einem elektronischen System, das die optoelektronischen Komponenten des Sensors überträgt und die Datenverarbeitung erlaubt.

Bei SPR-Messungen auf biosensorischer Ebene werden die Interaktionen eines an der Sensoroberfläche immobilisierten Reaktionspartners (= Ligand) mit einer zweiten Verbindung (= Analyt) in Lösung untersucht. Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Biosensoren messen dabei die Änderung des refraktiven Indexes der Lösung nahe der Sensoroberfläche, die während der

Komplexbildung der Bindungspartner oder der Dissoziation des Analyten vom Liganden auftritt (Markey, 1999). Daher können SPR-Biosensoren dazu verwendet werden, Interaktionen eines biologischen Systems, angefangen von Proteinen, Oligonucleotiden, Oligosacchariden, Lipiden bis hin zu kleinen Molekülen (< 400 Da), Phagen, viralen Partikeln und Zellen zu untersuchen (Rich und Myszka, 2000). Die Sensoroberfläche liefert dabei die Plattform, an der der Ligand von Interesse immobilisiert wird.

Zur Theorie der SPR-Messung und dem Geräteaufbau des in dieser Arbeit verwendeten Biacore® 3000 siehe Abschnitte 2.16.1 und 2.16.2.

1.7 Kopplung des biosensorischen Nachweises von Herbiziden mit der klassischen Analytik – SPR-MS

Die Kopplung des biosensorischen Nachweises über die Oberflächen-Plasmon-Resonanz mit der Massenspektrometrie führt zu einer bedeutenden Technologie, die für die Isolierung und Identifizierung von unbekanntem Bindungspartnern aus ungereinigten Proben eingesetzt werden kann (Rich und Myszka, 2000).

Die direkte Bindung eines Moleküls oder einer biologischen Struktur an die biologische Einheit auf der SPR-Oberfläche und die nachfolgende massenspektrometrische Untersuchung des gebundenen und eluierten („recoverten“) Analyten spielt eine bedeutende Rolle für SPR-Biosensoren in der Identifikation von neuen, bisher noch unbekanntem Bindungspartnern (Nedelkov und Nelson, 2003).

Mit einer solchen Kopplung zwischen einem SPR-Biosensor und der klassischen analytischen Methode der Massenspektrometrie ist es damit möglich, den Ansatz der wirkungsbezogenen Analytik zu verfolgen (Hock und Scheller, 2001; Obst und Brenner-Weiß, 2002). Die wirkungsbezogene Analytik verbindet die biomolekulare Erkennung und damit den Nachweis des biologischen Wirkpotentials eines Analyten mit der über die chemische Analyse erfolgenden exakten Identifikation der verursachenden Substanz(en). Sie liefert dabei sowohl Informationen über die Bioeffekte der Verbindung in Bezug zur verwendeten Zielstruktur als auch über die chemische Struktur und Konzentration von aktiven Substanzen in der untersuchten Probe (Hock und Scheller, 2001; Obst und Brenner-Weiß, 2002).

Übertragen auf einen SPR-Biosensor mit einer biologischen Einheit aus D1-Protein wäre es damit möglich, neue bisher noch nicht bekannte ökotoxikologische Stoffe aufgrund ihrer inhibierenden Wirkung auf das Photosystem II über die Kopplung der SPR mit der MS wirkungsbezogen zu identifizieren. Damit könnten unbekannte und/oder bisher nicht beachtete photosynthesehemmende und ökotoxikologische Substanzen aufgrund ihrer Wirkung an der Zielstruktur des D1-Proteins identifiziert werden.

Einsatzmöglichkeiten einer solchen Biosensor-SPR-MS-Kopplung für den Nachweis von photosynthesehemmenden Substanzen könnten beispielsweise die kontinuierliche Überwachung von Trinkwasser, Oberflächengewässern und Rohwasser sein. Bei einer entsprechenden Robustheit des Biosensors wäre darüber hinaus auch die Überwachung von Prozessabwässern bzw. Einläufen industrieller Kläranlagen möglich.

Eine vollständige Erfassung der Herbizide und anderer Photosystem-II-inhibierender Substanzen - dabei ist z. B. an noch stärker toxisch wirkende Abbauprodukte der Herbizide oder an noch nicht identifizierte ökotoxikologische Substanzen zu denken - ist alleine mit der klassischen chemischen Analytik zur Gewässerüberwachung nicht möglich. Ein auf dem D1-Protein und der SPR-Technologie basierender Biosensor kann demgegenüber die ökotoxikologischen Schadstoffe nur als Summenparameter aufgrund ihrer Wirkung an der biologischen Einheit erfassen.

Über das Konzept der wirkungsbezogenen Analytik, bei der die wirkungsbezogene Quantifizierung der Schadstoffe über die Biosensorik mit der Identifizierung über klassische chemische Methoden gekoppelt wird, wäre es in Zukunft möglich, noch nicht identifizierte Umweltschadstoffe aufzudecken, deren Toxizitätseffekt auf das Ökosystem bzw. den Menschen eventuell noch größer ist als der bereits bekannter Umweltschadstoffe.

In der Gewässerüberwachung ließe sich mit dieser Kopplung, wie in Abschnitt 1.5 bereits erwähnt, die Anzahl der Proben, welche durch chemische Analyseverfahren zu untersuchen sind, verringern, da nur die Proben, bei denen mit dem Biosensor ein positiver Nachweis von Schadstoffen erfolgt wäre, chemisch analysiert werden müssten.

1.8 Zielsetzung: Entwicklung einer geeigneten Aufreinigungsmethode für das D1-Protein zum Einsatz als biologische Einheit in einem SPR-Biosensor zum Nachweis von PS-II-Herbiziden

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Biosensors, basierend auf der biologischen Einheit eines Herbizid-bindefähigen D1-Proteins aus dem Photosystem II höherer Pflanzen, zum Nachweis von Photosystem-II-inhibierenden Substanzen. Grundlage dafür war die Isolierung eines D1-Proteins mit einer funktionell intakten und Herbizid-bindefähigen Q_B -Bindenische.

Im ersten Teil der Arbeit bestand das Ziel darin, eine Methode zu entwickeln, mit der es möglich ist, funktionsfähiges D1-Protein mit bindefähiger Q_B -Bindenische für PS-II-Inhibitoren aufzureinigen.

Eine der Aufgaben lag darin, den Erfolg der Aufreinigung des D1-Proteins aus verschiedenen Pflanzenspezies vergleichend zu charakterisieren, um so die Spezies mit der besten Eignung für die Isolation von D1-Protein zu identifizieren. Dabei spielten sowohl eine hohe Ausbeute, ein guter Aufreinigungsgrad und eine schnelle Durchführung der Aufreinigung als auch – im Besonderen - die Bewahrung einer bindefähigen Q_B -Bindenische eine große Rolle.

Zur Charakterisierung der verschiedenen Aufreinigungsschritte wurde unter anderem die Verwendung der klassischen Techniken der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) sowie des Western-Blottings angestrebt.

In Ergänzung dazu sollte eine neue Methode zum Nachweis von aufgereinigtem D1-Protein, basierend auf der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technologie, entwickelt und angewandt werden, damit das D1-Protein schneller und einfacher als mit den klassischen Methoden in isolierten Fraktionen detektiert werden konnte. Dazu galt es einen spezifischen Anti-D1-Antikörper an eine SPR-Sensorchipoberfläche zu immobilisieren, um über die Bindungsinteraktion von D1-Protein und Anti-D1-Antikörper schnell und einfach das D1-Protein in den Aufreinigungen zu identifizieren.

Zu den Zielen gehörte ferner, eine SPR-Methode zur qualitativen Charakterisierung der Herbizid-Bindefähigkeit des aufgereinigten D1-Proteins zu entwickeln, die auf einem modifizierten Herbizidliganden (Simazinderivat) basiert. Aufgabenstellung war es dabei, die Bewahrung der Bindefähigkeit des isolierten D1-Proteins zu Herbiziden über die Bindungsinteraktionen mit dem immobilisierten Simazinderivat zu kontrollieren.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Ziel verfolgt, das bindefähig aufgereinigte D1-Protein als biologische Einheit in einem Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Biosensor zum wirkungsbezogenen Nachweis von PS-II-Herbiziden einzusetzen.

Schließlich sollte an einem pflanzlichen Testsystem die Kopplung der Oberflächen-Plasmon-Resonanz mit der Massenspektrometrie untersucht werden. Dabei bestand das Ziel darin, den wirkungsbezogenen biosensorischen Nachweis mit der qualitativen Identifizierung im Sinne der wirkungsbezogenen Analytik zu verbinden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Pflanzenspezies

Es wurden folgende Pflanzenspezies zur Isolation des D1-Proteins bzw. der Thylakoide und der PS-II-Proteinkomplexe ausgewählt: *Vicia faba* var. *Dreifach Weiße*, *Lactuca sativa*, *Spinacea oleracea* sowie *Pisum sativum* var. *Feltham first* und var. *Maiperle*.

2.2 Anzuchtbedingungen

2.2.1 Anzucht in Klimakammern am IMBIO

Die Anzucht der Pflanzen am Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen (IMBIO) erfolgte in der Klimakammer, um weitgehend standardisierte Anzuchtbedingungen zu gewährleisten. Als Pflanzgefäße wurden Kunststoffpflanzschalen verwendet, die zur Verhinderung von Staunässe mit einem Gittereinsatz versehen waren. Das Kultursubstrat bestand aus gedämpfter Komposterde. Die Pflanzen wurden unter den in Tabelle 2.1 aufgeführten Bedingungen angezogen.

Lichtphase	12 Stunden
Dunkelphase	12 Stunden
Beleuchtungsstärke	10.000 – 14.000 Lux
Lampen	Quecksilberdampf Lampe (HLC-N-Phillips)
Temperatur	20 °C
Wasserversorgung	Täglich
Relative Luftfeuchtigkeit	80 %

Tab. 2.1 : Bedingungen zur Anzucht der Pflanzen in der Klimakammer am IMBIO.

2.2.2 Anzucht im Gewächshaus bei caesar

Im Gewächshaus im center of advanced european studies and research (caesar) wurden alle Pflanzen bei 25 °C und 80 % Luftfeuchtigkeit angezogen. Als Pflanzgefäße dienten auch hier Kunststoffpflanzschalen mit einem Gittereinsatz. Als Kultursubstrat wurde TKS-Einheitserde Typ 1 (Torfkultursubstrat Typ 1, Blaster Einheitserdewerk GmbH, Fröndenberg, D) verwendet. Um die besten Anzuchtbedingungen für die Isolation von hohen Ausbeuten an Herbizid-bindefähigem D1-Protein herauszufinden, wurden die Pflanzen parallel mit sowie ohne künstliche Zusatzbelichtung von 27.500 Lux (Lampen: Phillips Son-T Agro 400, Phillips, Hamburg, D) im 12 h Licht-/Dunkel-Rhythmus angezogen.

2.3 Thylakoidisolationmethoden

Bei allen durchgeführten Isolationsmethoden wurde bei 4 °C oder auf Eis und immer lichtgeschützt gearbeitet. Alle verwendeten Geräte und Lösungen waren auf 4 °C vorgekühlt. Dadurch sollten Lichtstress sowie temperaturabhängige Abbaureaktionen, die unter anderem zu einem Abbau des D1-Proteins führen können, minimiert werden (Champman *et al.*, 1989; Mattoo *et al.*, 1989).

Zur Isolation wurde das Blattmaterial von 14-18 Tage alten *Pisum sativum*- sowie *Vicia faba*-Pflanzen, von 5-6 Wochen alten *Lactuca sativa*- und von 11-13 Wochen alten *Spinacea oleracea*-Pflanzen verwendet. Die Blätter wurden geerntet und sofort in Eiswasser eingelegt. Zu Beginn der Isolation wurden die Blätter trockengetupft, eingewogen und unmittelbar weiterverarbeitet.

2.3.1 Thylakoidisolation nach Cohen & Baxter (1990)

Die Isolation der Thylakoidmembranen erfolgte nach der am Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen (IMBIO) modifizierten Methode von Cohen & Baxter (1990).

Die Blätter der verschiedenen Pflanzenspezies wurden in Isolationsmedium (s. Tab. 2.2) 10 s bei einer Drehzahl von 25.000 rpm (HO4A, Edmund-Bühler, Johanna Otto GmbH, Hechingen, D) homogenisiert.

0,4 M	Sorbit
50 mM	Tricin
10 mM	NaCl
10 mM	MgCl ₂
0,05 % (w/v)	Bovine serum albumin (BSA)
0,1 % (w/v)	Na-Ascorbat
pH 7,8 (KOH)	

Tab. 2.2 : Isolationsmedium nach Cohen & Baxter (1990).

MgCl₂ wurde verwendet, um eine bessere Trennung der Thylakoidmembranen vom Rest der Suspension während der Zentrifugation zu erreichen, da sich die Thylakoidmembranen in Anwesenheit von Mg²⁺ stapeln (Hincha und Schmitt, 1995). Natriumascorbat verhindert die Lipidperoxidation durch Abfangen entstehender Radikale, schützt damit die Thylakoidmembranen vor oxidativen Schäden (Takahama, 1982 und Biedinger *et al.*, 1991) und führt zu einer höheren Ausbeute an photosynthetisch aktiven Thylakoiden (Trapmann, 1999). Auch Merz (1995) verwendete Natriumascorbat zur Verminderung der oxidativen Abbaureaktion bei Thylakoidisolaten durch freigesetzte Enzyme. Rinderserumalbumin

(bovine serum albumin = BSA) dient zusätzlich zum Abfangen von Proteasen (Trapmann, 1999). Der pH-Wert des Mediums wurde auf 7,8 eingestellt, da dies dem physiologischen pH-Wert in den Thylakoiden entspricht (Santarius, 1990).

Das Homogenat wurde zuerst durch ein 200 µm und anschließend ein 20 µm Nygonsieb filtriert und bei 1.300 g für 5 min bei 4 °C (Allegra™ 21R, Beckman Coulter, Fullerton, USA) zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit einem Pinsel in Isolationsmedium resuspendiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt, wobei das Chloroplastenpellet im letzten Schritt in destilliertem Wasser aufgenommen wurde, um die Chloroplasten osmotisch aufzubrechen. Um ein Aufbrechen aller Chloroplasten zu ermöglichen, wurde nach 1 h Inkubationszeit die Suspension bei 30.000 g und im Anschluss bei 10.000 g (Optima L-100 XP mit Rotor 70 Ti, Beckman Coulter, Fullerton, USA) jeweils 10 min bei 2 °C zentrifugiert, wobei das Pellet in Isolationsmedium gewaschen wurde, um die äußeren Chloroplastenmembranen von den Thylakoidmembranen zu trennen. Zum Schluss wurden die Thylakoidmembranen zur weiteren Verarbeitung in Isolationsmedium aufgenommen.

2.3.2 Thylakoidisolation nach Bassi *et al.* (1985)

Bei der nach Bassi *et al.* (1985) am Max-Planck-Institut (MPI) Köln Vogelsang modifizierten Thylakoidisolationmethode wurde das frisch geerntete Blattmaterial in kaltem T1-Puffer (s. Tab. 2.3) 10 s bei einer Drehzahl von 25.000 rpm homogenisiert (HO4A, Edmund-Bühler, Johanna Otto GmbH, Hechingen, D). Das Homogenat wurde zuerst durch ein 200 µm und dann durch ein 20 µm Sieb filtriert und bei 1.400 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert (Multifuge 3 S-R, Heraeus, Hanau, D). Das Pellet wurde in kaltem T2-Puffer (s. Tab. 2.4) resuspendiert. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt bei 10.000 g für 10 min bei 4 °C wurden die Thylakoidmembranen in kaltem Lagerungs-Puffer (s. Tab. 2.5) aufgenommen.

0,5 % (w/v)	Milchpulver
0,4 M	Sorbit
0,1 M	Tricin
Protease Inhibitoren	
Werden dem T1-Puffer kurz vor Gebrauch zugesetzt:	
0,2 mM	Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)
1 mM	Benzamidin in 0,02 mM HEPES pH 7,5
5 mM	Aminocaprinsäure
pH 7,8 (KOH)	

Tab. 2.3 : T1-Puffer nach Bassi *et al.* (1985).

25 mM	HEPES pH 7,5 (KOH)
10 mM	EDTA

Tab. 2.4 : T2-Puffer nach Bassi *et al.* (1985).

50 % (v/v)	Glycerin
10 mM	HEPES pH 7,5 (KOH)
1 mM	EDTA

Tab. 2.5 : Lagerungs-Puffer nach Bassi *et al.* (1985).

2.3.3 Thylakoidisolation nach Piletskaya *et al.* (1997)

Bei der nach Piletskaya *et al.* (1997) durchgeführten Thylakoidisolation wurde das Blattmaterial in Isolationspuffer (s. Tab. 2.6) 10 s bei einer Drehzahl von 25.000 rpm homogenisiert (HO4A, Edmund-Bühler, Johanna Otto GmbH, Hechingen, D). Das Homogenat wurde zum weiteren Entfernen der Zellfragmente von den Chloroplasten bei 1.000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert (Multifuge 3 S-R, Heraeus, Hanau, D). Das Chloroplastenpellet wurde in Waschpuffer (s. Tab. 2.7) ohne Saccharose resuspendiert, um die Chloroplasten durch osmotischen Schock zum Platzen zu bringen und nochmals bei den oben angegebenen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, um die Thylakoidmembranen von den löslichen Stromaproteinen zu reinigen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Thylakoidmembranen in Waschpuffer aufgenommen.

0,4 M	Saccharose
10 mM	NaCl
50 mM	Tris
pH 8,0 (HCl)	

Tab. 2.6 : Isolationspuffer nach Piletskaya *et al.* (1997).

50 mM	Tris
10 mM	NaCl
pH 8,0 (HCl)	

Tab. 2.7 : Waschpuffer nach Piletskaya *et al.* (1997).

2.4 Isolation von Photosystems-II-Proteinkomplexen nach Piletskaya *et al.* (1997)

Die Isolation der Photosystem-II-Proteinkomplexe (PS-II-Proteinkomplexe) erfolgte nach der Butanolextraktionsmethode von Piletskaya *et al.* (1997). Bei der Butanolextraktion werden die PS-II-Proteinkomplex-Proteine von Pigmenten und Lipiden befreit (Piletskaya *et al.*, 1999). Die Thylakoidmembransuspension wurde zunächst für 30 min in einem eiskalten Ultraschallbad behandelt, um die Thylakoidmembranen für die weitere Protein-Aufreinigung aufzubrechen. Zur Solubilisierung der Thylakoidmembranproteine wurde die Suspension mit einem gleichen Volumen an -20 °C kaltem n-Butanol versetzt. Die zwei Phasen wurden intensiv geschüttelt und im Anschluss bei 1.000 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Die untere

wässrige Phase wurde gesammelt und mit dieser wurde die Butanolextraktion noch zweimal wiederholt, um die Reinheit der PS-II-Proteinkomplex-Proteine zu erhöhen.

Die so isolierten PS-II-Proteinkomplexe wurden in Aliquots lyophilisiert (s. Abschn. 2.9) und bei -20 °C gelagert.

2.5 Aufreinigung des D1-Proteins aus dem PS-II-Proteinkomplex mittels Fast protein liquid chromatography (FPLC)

Für die Aufreinigung des D1-Proteins aus dem PS-II-Proteinkomplex-Extrakt wurde die Umkehrphasenchromatographie (Reversed phase chromatography = RP-Chromatographie) verwendet. Laut Sharma *et al.* (1997a) handelt es sich bei der Umkehrphasenchromatographie um das am besten geeignete System zur Auftrennung von pflanzlichen Membranproteinen wie dem D1-Protein. Andere Chromatographiemethoden, z. B. die von ihnen getestete Gelfiltrations- und Ionenaustauscher-Chromatographie, zeigten sie als nicht geeignet für die Separation des D1-Proteins von dem ihm in Größe, Struktur und physikalischen Eigenschaften sehr ähnlichen D2-Protein (Sharma *et al.*, 1997a).

Bei der Umkehrphasenchromatographie findet eine hydrophobe Wechselwirkung des Analyten mit der unpolaren stationären Phase im polaren, wässrigen Lösungsmittel statt. Die Elution erfolgt mit Hilfe eines unpolaren organischen Lösungsmittels, das mit dem adsorbierten Molekül um die Bindungsstelle konkurriert. Die aufgegebenen Substanzen werden dabei in der Reihenfolge ihrer Polarität eluiert, bei der Umkehrphasenchromatographie ist die Polarität der stationären Phase geringer als die der mobilen Phase, daher eluiert die am stärksten polare Substanz zuerst (Lindsay, 1996)

Die Auftrennung der PS-II-Proteinkomplex-Proteine erfolgte mit C4- und C18-RP-Säulen (C4: 214TP15204 und C18: 218TP104, Grace Vydac, Hesperia, USA; C4: RP-304 und C18: RP318, BioRad, München, D), die stationäre Phasen aus Kieselgel mit Alkylresten in der Länge von C4 (Butyl) bzw. C18 (Octadecyl) besaßen. Da mit einer Fast-protein-liquid-chromatography-Anlage (FPLC-Anlage) gearbeitet wurde, die zur präparativen Aufreinigung ausgelegt war und die daher nur bis zu einem Druck von 3.000 psi arbeiten konnte, wurden Säulen mit einer Partikelgröße von 10 bzw. 15-20 µm verwendet, was allerdings zu einer Verminderung der Auflösung führte. Es wurden Säulen mit einer Porengröße von 300 Å ausgewählt, da diese zum Auftrennen von großen Molekülen wie Proteinen besser geeignet sind. Es wurden Säulen mit einer Dimension von 250 x 4,6 mm verwendet. Als Vorsäulen dienten C4- und C18-Materialien mit einer Partikelgröße von 10-30 µm (Grace Vydac, Hesperia, USA).

Die Fast protein liquid chromatography (FPLC) wurde mit einer bioinerten FPLC-Anlage (BioLogic Duo Flow, Bio-Rad, München, D) im Kühlschrank bei 4 °C durchgeführt. Die Chromatogramme wurden mit einem Quad-Tec-Detektor (BioLogic Quad Tec, Bio-Rad, München, D) bei vier verschiedenen Wellenlängen zwischen 214 und 360 nm aufgenommen. Eine Detektion im Maximum der UV-Absorption der Peptidbindung bei 195 nm konnte aufgrund der Spezifikationen des Detektors und aufgrund der Verwendung von Propanol, das eine Detektion unterhalb von 230 nm wegen der Eigenabsorption des Lösungsmittels nicht ermöglicht, nicht durchgeführt werden (Lottspeich und Zorbas, 1998). Stattdessen erfolgte nur eine wesentlich unempfindlichere Detektion der Tyrosin/Tryptophan-Seitengruppen bei ca. 280 nm. Die Fraktionen wurden in Intervallen von 1 min mit einem Fraktionssammler (BioLogic, Bio-Frac, Bio-Rad, München, D) ebenfalls bei 4 °C im Kühlschrank gesammelt.

2.5.1 D1-Protein-Aufreinigung nach der Methode von Sharma *et al.* (1997a)

Für die Aufreinigung des D1-Proteins aus dem PS-II-Proteinkomplexen, modifiziert nach der Methode von Sharma *et al.* (1997a), wurde als mobile Phase ein Gradient von 100 % 5%iger (v/v) Essigsäure zu 100 % 1-Propanol bei einer Flussrate von 0,3-0,5 ml/min verwendet.

Es wurden dazu verschiedene Gradienten der mobilen Phase (s. Tab. 2.8) sowie unterschiedliche stationäre C4- wie auch C18-Phasen getestet, um die Auftrennung der PS-II-Proteinkomplex-Proteine zu optimieren.

Auftrennungsgradient	Linear (% 1-Propanol)	Isokratisch (% 1-Propanol)	Linear (% 1-Propanol)	Isokratisch (% 1-Propanol)
1	0-100 % (60 min)	100 % (5 min)		
2	0-43 % (15 min)	43 % (20 min)	43-80 % (15 min)	80 % (5 min)
3	0-46 % (15 min)	46 % (20 min)	46-80 % (15 min)	80 % (5 min)
4	0-30 % (15 min)	30 % (10 min)	30-80 % (15 min)	80 % (5 min)

Tab. 2.8: Übersicht über die durchgeführten Gradientenauftrennungen nach der Methode von Sharma *et al.* (1997a). Angegeben sind jeweils der Prozentsatz (v/v) an 1-Propanol und in Klammern die Laufzeit in min.

2.5.2 D1-Protein-Aufreinigung nach der Methode von Piletskaya *et al.* (1997)

Bei der durchgeführten FPLC-Auftrennung der PS-II-Proteinkomplexe, modifiziert nach der Methode von Piletskaya *et al.* (1997) wurden ebenfalls stationäre C4- wie auch C18-Phasen verwandt. Im Unterschied zu der Methode von Sharma *et al.* (1997a) wurden hier jedoch die PS-II-Proteinkomplexe mit einem Gradienten der mobilen Phase von 50 mM Tris pH 8,0 zu

2-Propanol bei einem physiologischen pH-Wert aufgetrennt. Die Aufreinigungen wurden bei Flussraten von 0,3 ml und 0,6 ml/min durchgeführt.

Um eine Auftrennung zu erreichen, wurden die in Tabelle 2.9 angegebenen Gradienten der mobilen Phase getestet.

Auftrennungsgradient	Linear (% 2-Propanol)	Isokratisch (% 2-Propanol)	Linear (% 2-Propanol)	Isokratisch (% 2-Propanol)
1	0-100 % (30 min)	100 % (10 min)		
2	0-100 % (60 min)	100 % (25 min)		
3	0-100 % (60 min)	100 % (10 min)		
4	0-30 % (30 min)	30 % (20 min)		
5	0-30 % (30 min)	30 % (30 min)	30-100 % (20 min)	100 % (10 min)
6	0-43 % (10 min)	43 % (10 min)	43-100 % (15 min)	100 % (5 min)

Tab. 2.9: Übersicht über die durchgeführten Gradientenaufreinigungen nach der Methode von Piletskaya *et al.* (1997). Angegeben sind jeweils der Prozentsatz (v/v) an 2-Propanol und in Klammern die Laufzeit in min.

2.6 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes der Thylakoide nach Arnon (1949)

Die Chlorophyllbestimmungsmethode nach Arnon (1949) beruht auf der Extraktionsmöglichkeit von Chlorophyll durch eine 80%ige (v/v) Acetonlösung und der Bestimmung der optischen Dichte der zu messenden Lösung.

Es wurden jeweils 2 ml 80%iges (v/v) Aceton mit 20 µl Thylakoidmembransuspension versetzt, durchmischt und 3 min bei 10.000 g (Allegra™ 21R, Beckman Coulter, Fullerton, USA) zentrifugiert. Die optische Dichte des dekantierten Chlorophyllextraktes wurde bei 645 und 663 nm photometrisch (HeLIOS α, Thermo Spectronic, Dreieich, D) bestimmt. Von jeder zu messenden Thylakoidsuspension wurden vier Wiederholungen angesetzt, die je viermal bei jeder Wellenlänge photometrisch vermessen wurden.

Aus den 16 erhaltenen Messwerten für jede Probe wurden für jede Wellenlänge die arithmetischen Mittel gebildet und der Chlorophyllgehalt nach folgender Formel (2.1) bestimmt:

$$(\Delta E_{x_{663}} \times 8,02 + \Delta E_{x_{645}} \times 20,2) \times Vf = \mu\text{g Chlorophyll/ml}$$

$E_{x_{663}}$ = Extinktion bei 663 nm, $E_{x_{645}}$ = Extinktion bei 645 nm, Vf = Verdünnungsfaktor

Formel 2.1: Formel zur Berechnung des Chlorophyllgehaltes in µg/ml nach Arnon (1949), Vf = 100.

2.7 Fluoreszenzmessungen mit der Puls-Amplituden-Modulation

Die Fluoreszenzmessungen wurden mit dem PAM-2000 (Walz, Effeltrich, D) bzw. dem ToxY-PAM/R-Messgerät (Walz, Effeltrich, D) durchgeführt, die mit dem Prinzip der Puls-Amplituden-Modulation (PAM) arbeiten.

Beim Puls-Amplituden-Modulations-Messprinzip wird die Fluoreszenz durch sehr kurze, aber starke Lichtimpulse einer Licht emittierenden Diode (LED) mit einem Emissionsmaximum im kurzwelligen Rot von 650 nm beim PAM-2000 und 655 nm beim ToxY-PAM/R angeregt. Um zwischen der Fluoreszenz und anderen Lichtsignalen unterscheiden zu können, wird das Anregungslicht „moduliert“, d. h. es wird in 3 μs (PAM-2000) bzw. 5 μs (ToxY-PAM/R) Pulsen abgegeben (Walz, 1993), das Fluoreszenzsignal folgt diesem an/aus Muster, ein hochselektiver Puls-Verstärker unterdrückt alle Hintergrundsignale und ein Photodetektor erfasst nur die synchron mit den Messpulsen erfolgende Signalerhöhung (Schreiber, 1997).

Beim **ToxY-PAM/R** werden sowohl das Anregungslicht als auch die sättigenden Lichtblitze durch LEDs mit einer Wellenlänge von 655 nm abgegeben (Popp, 2004). Die Signaldetektion erfolgt aufgrund eines internen Filters erst oberhalb von 690 nm. Dieses soll verhindern, dass es aufgrund der relativen Nähe zum Anregungslicht im Fluoreszenzmaximum zu einer Überlagerung der Lichtsignale kommt.

Beim **PAM-2000** werden die sättigenden Lichtblitze durch blau angereichertes Halogenlicht von 8V/20W mit einer Wellenlänge von weniger als 710 nm abgegeben (Walz, 2001). Zusätzlich wird hier Streulicht durch kontinuierliches aktinisches Licht von 665 nm ausgeschaltet, da die Messungen in einer lichtdurchlässigen Messkammer durchgeführt werden. Dieses Streulicht entfällt beim ToxY-PAM/R, da die Messungen in einer lichtundurchlässigen Kammer im Dunkeln durchgeführt werden.

2.7.1 Vitalitätsbestimmung der isolierten Thylakoide über Fluoreszenzmessung mit der Puls-Amplituden-Modulation

Die Vitalität der isolierten Thylakoidmembranen wurde über Fluoreszenzmessung mittels der Puls-Amplituden-Modulation bestimmt. Als Meßgröße wurde der Yield verwandt.

Sowohl die Grundfluoreszenz bei Messlicht als auch die maximale Fluoreszenz bei einem die Chlorophyllmoleküle der Elektronentransportkette absättigenden Lichtblitz wurden durch die Fluorometer Toxy-PAM/R bzw. PAM-2000 bestimmt. Aus diesen zwei Messgrößen konnte die Aktivität des photosynthetischen Elektronentransportes (PET) bestimmt werden. Aus der Differenz der maximalen Fluoreszenz bei Lichtsättigung (F_m') zur Grundfluoreszenz bei Messlicht (F_t), bezogen auf die maximale Fluoreszenz bei Lichtsättigung (F_m'), ergibt sich

die Quantenausbeute und damit die Aktivität des photosynthetischen Elektronentransportes (speziell des PS II) nach der Formel 2.2 (Genty *et al.*, 1989). Diese wird in Form der Messgröße Yield (Genty *et al.*, 1989) ausgedrückt.

$$\text{Yield} = F_m' - F_t / F_m'$$

Formel 2.2: Formel zur Berechnung des Yields.

Folgender Messansatz wurde zur Bestimmung der Aktivität der Thylakoidproben im ToxY-PAM/R bzw. PAM-2000 verwendet:

ToxY-PAM/R:

2950 µl	Aq. dest.
25 µl	Messpuffer (s. Tab. 2.10)
25 µl	Thylakoidsuspension 1:10 verdünnt

PAM-2000:

950 µl	Aq. dest.
25 µl	Messpuffer (s. Tab. 2.10)
25 µl	Thylakoidsuspension 1:10 verdünnt

Der Yield der Thylakoidproben wurde im ToxY-PAM/R durch sieben aufeinanderfolgende Messungen im Abstand von 1 min bestimmt, aus denen das arithmetische Mittel gebildet wurde. Im PAM-2000 wurde der Yield aus dem arithmetischen Mittel von zehn aufeinanderfolgenden Messungen im Abstand von 3 s nach einer vorhergehenden Inkubationszeit der Probe in der Messkammer von 2 min berechnet.

500 mM	KH ₂ PO ₄
1,5 M	K ₂ HPO ₄
400 mM	NaCl
80 mM	NH ₄ Cl
0,5 mM	Flavinmononukleotid (FMN)
10 mM	MgCl ₂ x 6 H ₂ O
pH 7,5 (KOH)	

Tab. 2.10 : Zusammensetzung des Messpuffers nach Schnabl und Youngman (1987); 40fach konzentriert.

2.7.2 Messung von Herbiziden mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor über die Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometrie

Mittels der Fluoreszenzmessungen sollte die Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes von Thylakoidmembranen durch PS-II-Herbizide bestimmt werden.

Durch die Puls-Amplituden-Modulations-Technik (PAM) des Fluorometers Toxy-PAM/R ist die Fluoreszenz als feste Größe messbar und aus der Berechnung des Yields (s. Formel 2.2) ergibt sich ein brauchbares Mittel zur Berechnung der Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes (PET).

Indem man den Yield der Probe in Beziehung zum Yield der gleichzeitig gemessenen Kontrollen setzt, kann die prozentuale Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes (PET) nach Formel 2.3 berechnet werden.

$$100 - (\bar{\text{Yield}}_{\text{Probe}} / \bar{\text{Yield}}_{\text{umgebende Kontrollen}}) \times 100 = \text{Hemmung PET (\%)}$$

$\bar{\text{Yield}}$ = Mittelwert

Formel 2.3: Formel zur Berechnung der Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes (PET).

Für den Nachweis der Hemmung des PET durch die Herbizide wurde folgender Messansatz im Toxy-PAM/R verwendet:

Kontrolle:	Herbizidprobe:
2200 µl Aq. dest.	2200 µl Aq. dest.
750 µl 0,01 % (v/v) Methanol	750 µl Herbizidprobe, variierende Konz; in 0,01 % (v/v) Methanol
25 µl Thylakoide (eingestellt auf eine Fm` von 1500)	25 µl Thylakoide (eingestellt auf eine Fm` von 1500)
25 µl Messpuffer	25 µl Messpuffer

Zur Bestimmung der Hemmung des PET durch die Herbizidproben wurden die Kontrollen wie auch die Herbizidproben parallel in sieben aufeinander folgenden Messungen in Abständen von je 1 min gemessen. Durch den geräteinternen Bezug der Messwerte der Herbizidprobe zur Kontrolle wurde die Hemmung des PET (%) für jede Messung direkt bestimmt.

Aus den letzten vier Messungen wurde das arithmetische Mittel zur Bestimmung der Hemmung des PET durch das jeweilige Herbizid gebildet.

2.8 Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford (1976)

Der Proteingehalt der PS-II-Proteinkomplex-Extrakte wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Diese Methode beruht auf dem Prinzip, dass sich das Absorptionsmaximum des Coomassie®-Brillantblaus in Gegenwart von Proteinen und in saurem Milieu von 465 nm zu 595 nm verschiebt. Damit kann die in einer Probe enthaltene Menge an Proteinen bei 595 nm im Photometer gemessen und im Bezug zu Eichkonzentrationen bestimmt werden.

1 µl Probe bzw. Eichlösung wurde zu 1 ml Bradfordreagenz 1x (Bio-Rad Protein Assay Dye 5 x Konzentrat, Bio-Rad, München, D) gegeben, durchmischt und 5–10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die optische Dichte photometrisch (HeLIOS α , Thermo Spectronic, Dreieich, D) bei 595 nm bestimmt. Jede Probe bzw. Eichlösung wurde mit dreifacher Wiederholung gegen eine Kontrolle, der anstelle der Probe Probenpuffer zugesetzt wurde, gemessen; aus den Messwerten wurde das arithmetische Mittel gebildet.

Als Eichlösungen wurden BSA-Eichkonzentrationen von 0-1 µg/µl verwendet. Aus den erhaltenen Werten für die Eichlösungen wurde in Excel eine Eichgerade erstellt, anhand derer die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden konnte. Falls notwendig, wurden die Proben verdünnt, um sie im angegebenen linearen Eichbereich messen zu können.

2.9 Lyophilisation von PS-II-Proteinkomplexen, D1-Proteinen sowie FPLC-Fraktionen

Die Lyophilisation ist eine Technik zur Dehydratisierung von Substanzen, bei der einer Substanz mehr als 90 % ihres Wassergehaltes entzogen wird (Franks, 1990). Bei der Lyophilisation oder Gefriertrocknung wird das Lösungs- und/oder Suspensionsmittel einer Substanz bei tiefen Temperaturen direkt aus der festen in die gasförmige Phase überführt, um die verbleibende Festsubstanz zu trocknen (Oetjen, 1997). Die Lyophilisation macht sich das physikalische Prinzip der Sublimation zunutze, d. h. den direkten Übergang vom festen in den gasförmigen Zustand. Bei der Gefriertrocknung wird eine Substanz (hier PS-II-Proteinkomplexe, D1-Proteine und FPLC-Fraktionen) zuerst gefroren, bevor ihr anschließend das Wasser durch Sublimation unter Vakuum entzogen wird (Franks, 1990). Bei 6,1 mbar, dem Punkt, an dem alle drei Aggregatzustände des Wassers vorliegen, geht Wasser direkt vom festen in den gasförmigen Zustand über. Daher wird zur Sublimation ein Unterdruck von weniger als 6,1 mbar benötigt. Ist der Substanz das „freie Wasser“ vollständig entzogen worden, kann man durch ein sehr tiefes Vakuum bzw. durch eine Erhöhung der Temperatur auch noch das kristallin gebundene Wasser entziehen. Da die Dehydratisierung bei geringen Temperaturen durchgeführt wird, ist die Methode sehr schonend für sensitive Stoffe wie Proteine, Enzyme und andere Substanzen. Stoffwechsel- und Enzymfunktionen kommen durch die Lyophilisation zum Stillstand. Die Gefriertrocknung hat sich daher in den letzten Jahren als Standardmethode zur Konservierung von labilen Materialien über längere Zeiträume etabliert und ist die schonendste Methode, Materialien zu trocknen (Franks, 1990). In dieser Arbeit kam die Lyophilisation zur Lagerung der aufgereinigten PS-II-Proteinkomplexe sowie D1-Proteine, hauptsächlich aber zur Konzentrierung der Proteine und FPLC-Fraktionen zum Einsatz. Sie wurde abgewandelt nach der Methode von Zimmermann

et al. (1996) durchgeführt. Die PS-II-Proteinkomplexe, D1-Proteine und FPLC-Frak­tionen wurden in einer Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 der Firma Christ® (Osterode, D) lyophilisiert, wobei das Programm Thylakoide 1A mit folgendem Programmablauf verwendet wurde:

Temperatur	Zeit	Druck	Programmabschnitt
> -30 °C		Atmosphärisch	Beladen
-30 °C	1 h	Atmosphärisch	Gefrieren
-20 °C	30 min	Atmosphärisch	Gefrieren
-20 °C	10 min	0,420 mbar	Haupttrocknung
-20 °C	20 h	0,420 mbar	Haupttrocknung
-10 °C	1 h	0,420 mbar	Haupttrocknung
-10 °C	1,5 h	0,420 mbar	Haupttrocknung
0 °C	1 h	0,420 mbar	Haupttrocknung
0 °C	1 h	0,420 mbar	Haupttrocknung
10 °C	1 h	0,420 mbar	Haupttrocknung
10 °C	1 h	0,420 mbar	Haupttrocknung
20 °C	1 h	0,420 mbar	Haupttrocknung
20 °C	11 h	0,420 mbar	Haupttrocknung
20 °C	10 min	0,01 mbar	Nachtrocknung
20 °C	3 h	0,01 mbar	Nachtrocknung

Tab. 2.11 : Gefriertrocknungsprogramm Thylakoide 1A.

2.10 Konzentrierung von PS-II-Proteinkomplexen und FPLC-Frak­tionen

2.10.1 Vakuumzentrifugation von FPLC-Frak­tionen

Zur Konzentrierung von D1-Proteinen wurde neben der Lyophilisation auch die Methode der Vakuumzentrifugation verwendet. Dazu wurden die FPLC-Frak­tionen zum Teil in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf, Wesseling, D) getrocknet. Die Vakuumzentrifugation wurde über eine Dauer von 5-10 h bei Raumtemperatur durchgeführt, solange bis die Frak­tionen fast vollständig getrocknet waren. Durch die Aufheizung während der Zentrifugation kam es zu einer Erhöhung der Temperatur in der Zentrifuge auf bis zu 40 °C.

2.10.2 Konzentrierung von PS-II-Proteinkomplexen über Konzentrierungseinheiten

Teilweise erfolgte eine Konzentrierung der PS-II-Proteinkomplexe vor der Auftrennung über die FPLC. Dazu wurden die im Folgenden aufgeführten Konzentrierungseinheiten verwendet:

- **Centricon YM-10** mit einem Molekulargewichts-cut-off (MWCO) von 10.000 Da für Proben bis 2 ml Volumen (Millipore, Schwalbach, D).

Die Proben wurden 75-85 min bei 5.000 g und 4 °C zentrifugiert (Allegra™21R, Beckman Coulter, Fullerton, USA), um die PS-II-Proteinkomplexe aufzukonzentrieren. Dann wurde das Reservoir mit dem Retentat invertiert und 2 min bei 1.000 g und 4 °C zentrifugiert, um die konzentrierten Proteinkomplexe zu erhalten.

- **Microcon YM-10** mit einem Molekulargewichts-cut-off von 10.000 Da für Proben bis 0,5 ml Volumen (Millipore, Schwalbach, D).

Die Zentrifugation und damit die Konzentrierung der PS-II-Proteinkomplex-Extrakte dauerte 30-60 min bei 14.000 g und 4 °C (Allegra™21R, Beckman Coulter, Fullerton, USA). Es folgte die Invertierung des Probenreservoirs, die PS-II-Proteinkomplexe wurden durch dreiminütige Zentrifugation bei 1.000 g und 4 °C zurückgewonnen.

- **Amicon Ultra-4** mit einem Molekulargewichts-cut-off von 10.000 Da für Proben bis 4 ml (Millipore, Schwalbach, D).

Zur Konzentrierung wurden die PS-II-Proteinkomplex-Extrakte 30-60 min bei 4.000 g und 4 °C (Multifuge 3 S-R, Heraeus, Hanau, D) zentrifugiert. Anschließend konnten die konzentrierten Proteinkomplexe direkt aus dem zurückgebliebenen Retentat zurückgewonnen werden.

2.11 Filtration von PS-II-Proteinkomplexen

Einige der extrahierten PS-II-Proteinkomplexe wurden vor der weiteren Auftrennung über die FPLC filtriert, um Verunreinigungen, die größer als das gesuchte D1-Protein waren, aus den Extrakten herauszufiltern. Der Zweck bestand in der Vorreinigung der Extrakte und in der Vermeidung einer Verstopfung der Chromatographie-Säule. Es wurden die folgenden Spitzenfilter verwendet:

- Spartan 3/0,45 PA: 0,45 µm Porengröße, mit einem Durchmesser von 4 mm, Material: Polyacetat (PA) (Schleicher & Schuell, Dassel, D)
- Millex®-HV: 0,45 µm Porengröße, mit einem Durchmesser von 4 mm, Material: Polyvinylidenfluorid (PVDF) (Millipore, Schwalbach, D)
- Membrex 4 PVDF: 0,45 µm Porengröße, mit einem Durchmesser von 4 mm, Material: Polyvinylidenfluorid (PVDF) (MembraPure, Bodenheim, D)

2.12 Dialyse von PS-II-Proteinkomplexen

Zum schonenden Pufferaustausch wurden die PS-II-Proteinkomplexe teilweise dialysiert. Die Dialyse wurde nach Sharma *et al.* (1997a) durchgeführt. Vor der Dialyse erfolgte eine Lyophilisation und Konzentrierung der PS-II-Proteinkomplexe mit Aq. dest. im Verhältnis 10:1. Die Dialyse wurde in vorgefertigten Dialyseschlaucheinheiten (Spectra/Por RC Irridated Dispo Dialyzer, Spectrum Europe, Breda, NL) aus regenerierter Cellulose mit einem Molekulargewichts-cut-off (MWCO) von 15.000 Da durchgeführt. Die Dialyseeinheiten besaßen einen Durchmesser von 5 mm und waren für ein Probenvolumen von maximal 1 ml ausgelegt. Die in Aq.dest. gelagerten Dialysemembranen wurden vor der Verwendung mit Aq.dest. ausgespült und anschließend mit dem PS-II-Proteinkomplex-Extrakt befüllt. Anschließend wurde die Dialyse gegen 2 x 2 l 5%ige (v/v) Essigsäure bei 4 °C in der Kühlkammer für 24 h durchgeführt.

2.13 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Methode der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis = SDS-PAGE) erlaubt die Auftrennung von Proteingemischen aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts. SDS überdeckt die Eigenladungen der Proteine, so dass Micellen mit ca. 1,4 g SDS pro g Protein mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen. Bei der Elektrophorese im Polyacrylamidgel mit 0,1 % SDS erhält man über einen bestimmten Bereich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molekulargewichte und den Wanderungstrecken der SDS-Polypeptid-Micellen (Lottspeich und Zorbas, 1998). Mit Hilfe von mitgelaufenen Molekulargewichtsstandards können die Molekulargewichte der Proteine bestimmt werden.

Die Auftrennung der Thylakoidmembranen, PS-II-Proteinkomplexe sowie FPLC-Fractionen erfolgte, um eine hohe Auflösung zu erhalten, mit 10-16%igen Polyacrylamid-Gradientengelen nach der Methode von Schagger und Jagow (1987).

2.13.1 Probenvorbereitung

Die PS-II-Proteinkomplex-Extrakte wurden mit einem festgelegten Proteingehalt von 20 µg (nach Bradford bestimmt, s. Abschn. 2.8), die Thylakoidextrakte mit einem Chlorophyllgehalt von 5 µg (nach Arnon bestimmt, s. Abschn. 2.6) auf das SDS-PAGE aufgetragen. Die lyophilisierten FPLC-Fractionen wurden, im Verhältnis 1:10 konzentriert, auf das SDS-

PAGE geladen. Dazu wurden das benötigte Volumen an Protein- bzw. Thylakoidprobe sowie die konzentrierten FPLC-Fraktionen 1:1 mit Denaturierungspuffer (s. Tab. 2.12) vermischt.

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1 ml
Glycerol	0,8 ml
10 % SDS (w/v)	0,8 ml
2- β -Mercaptoethanol	0,4 ml
0,05 % Bromphenolblau (w/v)	0,2 ml nur bei nicht gefärbten Proben
6 M Harnstoff	
Mit Aq. dest. auf 8 ml auffüllen	

Tab. 2.12 : Denaturierungspuffer.

Anschließend wurden die Proben geschüttelt, 5 min bei 100 °C im Wasserbad erhitzt und im Quick-Spin-Modus bei 10.000 g (Allegra™ 21R, Beckman Coulter, Fullerton, USA) zentrifugiert. Als Marker wurden 20 μ l des Prestained-Protein-Markers, broad range, P7708S von der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main, D) verwendet, da dieser eine Marker-Bande bei 32,5 kDa aufweist, der im SDS-PAGE nachweisbaren Größe des D1-Proteins.

2.13.2 Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine wurde ein 10-16%iges Polyacrylamid-Gradientengel als Trenngel verwendet. Die 1,5 mm dicken Gradientengele wurden mit Hilfe eines Gradientenmischers (Gradient Former Model 485, BioRad, München, D) aus 10%igen und 16%igen Acrylamidlösungen (s. Tab. 2.13) gegossen.

Chemikalie	16 % Vol_{tot} 24 ml	10 % Vol_{tot} 24 ml
Acrylamid (32:1)	8,3 ml	5,2 ml
3 M Tris pH 8,45	8,3 ml	8,3 ml
Saccharose	4,4 g	1,25 g
Mit Aq. dest. auf x ml auffüllen	24 ml	24 ml
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)	10 μ l	10 μ l
Ammoniumpersulfat (APS) 10 % (w/v)	60 μ l	60 μ l

Tab. 2.13 : Zusammensetzung der 16- und 10%igen Acrylamidlösungen für das Trenngel.

Nach dem Gießen des Gradientengels wurde dieses mit Aq.dest. überschichtet, um eine gerade Abschlusskante zu erhalten. Nach der Auspolymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel (s. Tab 2.14) aufgegossen und ein Kamm eingefügt.

Acrylamid (32:1)	1,3 ml
3 M Tris pH 8,45	4 ml
Mit Aq. dest. auf x ml auffüllen	16 ml
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)	20 µl
Ammoniumpersulfat (APS) 10 % (w/v)	120 µl

Tab. 2.14 : Zusammensetzung des Sammelgels.

Als oberer und unterer Laufpuffer wurden folgende Puffer verwendet (s. Tab. 2.15 und 2.16).

0,1 M	Tris
0,1 M	Tricin
1 mM	EDTA
0,1 % (w/v)	SDS

Tab. 2.15 : Zusammensetzung des oberen Laufpuffers.

0,2 M	Tris pH 8,9
-------	-------------

Tab. 2.16 : Unterer Laufpuffer.

Die Auftrennung der Proteine im Gel (Gelkammer: Twin L, Peqlab, Erlangen, D) erfolgte bei Raumtemperatur zuerst für 2 h bei 50 V, danach über Nacht bei konstant 100 V, bis die Pigmente bzw. das Bromphenolblau den Boden des Gels erreicht hatten.

2.13.3 Färbung der Gele mit Coomassie®-Brilliantblau

Die Gele wurden zunächst 3 x 10 min in Aq. dest. gewaschen. Anschließend wurden sie 1 h bei leichtem Schütteln (Belly Dancer, Stovall, Greensboro, USA) in BioRad Biosafe Coomassie® (BioRad, München, D) gefärbt. Danach wurden die gefärbten Gele über Nacht in Aq. dest. entfärbt, wobei das Aq. dest. mehrmals gewechselt wurde.

2.13.4 Geldokumentation

Die gefärbten Gele wurden in einer Geldokumentationsanlage (Bio-Rad Gel Doc 2000, Bio-Rad, München, D) optisch erfasst und elektronisch weiterverarbeitet.

Eine densitometrische Auswertung der Gele auf die enthaltene Menge an D1-Protein konnte nicht erfolgen, da dazu weder Anlage noch Software zur Verfügung standen. Zusätzlich war zuerst kein D1-Protein-Standard verfügbar. Ein ab Mitte 2005 käuflich erwerbbarer Histidin-markierter D1-Protein-Standard (AS01-016S, Agrisera, Vännäs, S) stellte sich bei den Untersuchungen als ein PS-II-Proteinkomplex heraus und konnte daher ebenfalls nicht für eine Auswertung verwendet werden. Bei dem Vergleich mit einem anderen Proteinstandard (z. B. Recombinase A) wäre nur ein Annäherungswert zu erzielen gewesen. Der Coomassie®-Farbstoff bindet relativ unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten

der Proteine. Am größten sind die Wechselwirkungen mit Arginin, geringer die mit Lysin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin (Lottspeich und Zorbas, 1998). Aufgrund der differierenden Aminosäurezusammensetzung des untersuchten D1-Proteins und eines Proteinstandards (z. B. Recombinase A) kommt es damit zu einer unterschiedlichen Anfärbung der Proteine.

2.14 Western-Blotting

Im Anschluss an die Proteinauftrennung im SDS-PAGE wurden die Proteine im so genannten Wet-Blot-Verfahren auf eine Blotting-Membran übertragen, um das D1-Protein über die Antigen-AK-Bindung mit einem Anti-D1-Antikörper über das Chemilumineszenzverfahren sichtbar zu machen.

Die Durchführung des Western-Blots erfolgte nach der Methode von Towbin *et al.* (1979). Zur Übertragung der im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Blotmembran wurden folgende Komponenten von der negativen zur positiven Elektrode zusammengesetzt: 1 Schwamm, 4 Lagen Blottingpapier (Schleicher und Schuell, Dassel, D), SDS-PAGE, PVDF-Membran 0,45 µm (Immobilon P, Millipore, Schwalbach, D), 4 Lagen Blotting paper, 1 Schwamm. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte in einer Wet-Blot-Apparatur (EB20, Peqlab, Erlangen, D) über Nacht bei 4 °C und 300 mA in der Kühlkammer mit dem in Tabelle 2.17 angegebenen Blotpuffer.

15 g	Tris
70 g	Glycin
1 l	Methanol
Mit Aq. dest. auf 5 l auffüllen	

Tab. 2.17 : Zusammensetzung des Blotpuffers.

Nach dem Blotten wurde die Blotmembran für 1 h bei Raumtemperatur mit der in Tabelle 2.18 angegebenen Blocking-Lösung unter leichtem Schütteln (Belly Dancer, Stovall, Greensboro, USA) geblockt, um freie Bindungsstellen auf der Blotmembran mit Milchpulver abzusättigen.

5 % (w/v)	Magermilchpulver
0,1 % (v/v)	Tween
1 X	TBS (s. Tab. 2.19)

Tab. 2.18 : Zusammensetzung Blocking-Lösung.

100 mM	Tris/HCl pH 8,0
1,5 M	NaCl

Tab. 2.19 : Zusammensetzung 10 x TBS.

Die Inkubation mit dem primären Antikörper (AK) wurde für 3 h bei Raumtemperatur mit einem 1:4.000 in Blocking-Lösung verdünnten polyklonalen Anti-D1-Antikörper (AS02-017, Agrisera, Vännäs, S) durchgeführt. Danach wurden die Blots dreimal für je 10 min mit folgender Waschlösung gewaschen (s. Tab. 2.20).

0,1 % Tween in 1 X TBS

Tab. 2.20 : Waschlösung.

Die Hybridisierung der Blots mit dem sekundären, mit Horseradish-Peroxidase (HRP) konjugierten polyklonalen Rabbit-Anti-IgY-Antikörper (ab6753, Abcam Limited, Cambridgeshire, GB) erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Es wurde eine Verdünnung von 1:4.000 in Blocking-Lösung verwendet. Im Anschluss wurden die Blotmembranen fünfmal für je 5 min in Waschlösung (s. Tab. 2.20) gewaschen.

Die Detektion des Anti-D1-Antikörpers erfolgte mit Hilfe von Chemilumineszenz mit den ECL-Western-Blotting-Detektionsreagenzien der Firma Amersham Biosciences (Freiburg, D). Die an den sekundären Antikörper konjugierte Horseradish-Peroxidase (HRP) katalysiert die Oxidation von Luminol unter alkalischen Bedingungen. Direkt nach der Oxidation befindet sich das Luminol in einem angeregten Zustand, bei dessen Rückkehr in den Grundzustand es Licht abgibt, was als Chemilumineszenz bezeichnet wird. Durch die Zugabe von Enhancern wie z. B. Phenol zu der Reaktion wird die Lichtabgabe um das ca. Tausendfache erhöht und die Emissionszeit verlängert. Die maximale Lichtemission findet bei einer Wellenlänge von 428 nm statt, die mit einem Blaulicht sensitiven Autoradiographiefilm (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, Freiburg, D) detektiert werden kann.

Zur Entwicklung der Blotmembranen wurden diese mit Blottingpapier (Schleicher und Schuell, Dassel, D) getrocknet, mit je 3 ml der ECL-Lösungen A und B (Amersham Biosciences, Freiburg, D) inkubiert und einem für Chemilumineszenz empfindlichen Film ausgesetzt (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, Freiburg, D). Dieser wurde sofort in einer Fotoentwicklungsmaschine (Fujifilm FPM-100A, Fuji, Düsseldorf, D) entwickelt.

Auswertung der Western-Blots

Die Fotografien der durchgeführten Western-Blots wurden zur Visualisierung mit einem Scanner (CanoScan, N656 U, Canon, Krefeld, D) bei 150 dpi eingescannt. Der in der Aufnahme des Western-Blots nicht sichtbar werdende Marker wurde nachträglich, über Vergleich mit den gefärbten Markerbanden auf der Blotmembran, mit einer Bildbearbeitungssoftware (Photoshop) eingezeichnet. Auch hier konnte eine densitometrische Auswertung aufgrund der in Abschnitt 2.13.4 erläuterten Gründe nicht erfolgen.

2.15 Synthese einer Simazinhexansäure nach Goodrow *et al.* (1990)

Die Simazinhexansäure 6-{{4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl}amino}-hexansäure wurde nach der Methode von Goodrow *et al.* (1990) synthetisiert.

2.15.1 Erster Schritt der Synthese

Dazu wurde zu einer gut gerührten Lösung von 9,22 g (50 mmol) Cyanurchlorid in 400 ml -20 °C kaltem Ether über 45 min eine Lösung aus 3,35 g (52 mmol) Ethylamin (70 Massenprozent in Wasser) und 6,72 g (52 mmol) N,N-Diisopropylethylamin, gelöst in 50 ml Ether, langsam hinzugegeben. Die Mischung wurde filtriert und das Filtrat nacheinander mit 25 ml 1 M HCl, 25 ml 5%igem (w/v) NaHCO₃ und zweimal 25 ml gesättigtem NaCl gewaschen und mit MgSO₄ getrocknet. Der Ether wurde in einem Rotationsverdampfer unter Unterdruck entzogen und dabei die Lösung auf ein Volumen von 25 ml eingedampft. Durch die nachfolgende Zugabe von 25 ml Hexan und die Kühlung der Lösung auf 4 °C konnte kristallines 4,6-Dichloro-N-ethyl-1,3,5-triazin-2-amin synthetisiert werden (s. Abb. 2.1). Der Nachweis über die Synthese des 4,6-Dichloro-N-ethyl-1,3,5-triazin-2-amin konnte mittels einer Dünnschichtchromatographie erbracht werden (s. Abschn. 2.15.3).

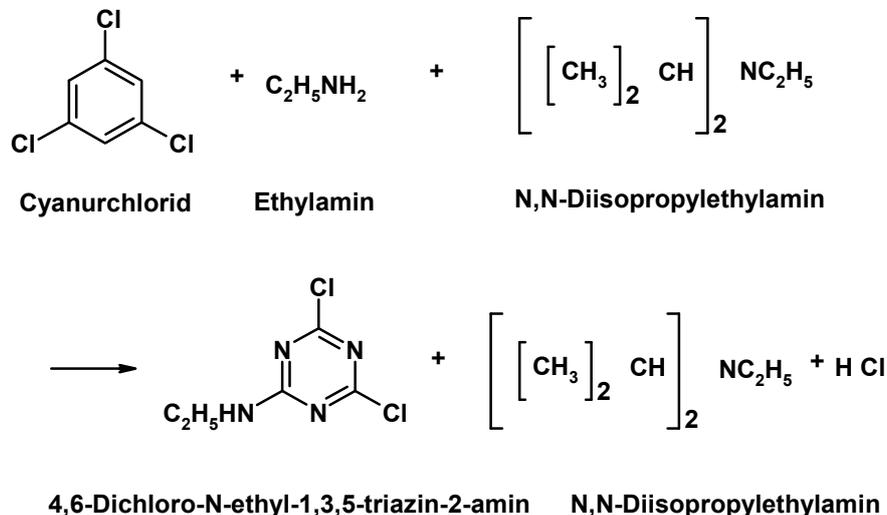


Abb. 2.1 : Erster Schritt der Synthese.

2.15.2 Zweiter Schritt der Synthese

0,725 g 4,6-Dichloro-N-ethyl-1,3,5-triazin-2-amin, 0,525 g (4 mmol) 6-Amino-hexansäure und 1,01 g (8 mmol) N,N-Diisopropylethylamin wurden in 30 ml absolutem Ethanol gelöst und unter Rühren 9 h bei 60-65 °C erhitzt, bis die Abwesenheit von 4,6-Dichloro-N-ethyl-1,3,5-triazin-2-amin durch Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden konnte.

Im Anschluss wurde die Lösung gekühlt und die Flüssigkeit bei verringertem Druck in einem Rotationsverdampfer entfernt. Der Reststoff wurde in 75 ml 5%igem (w/v) wässrigen NaHCO₃ gelöst und zweimal mit je 20 ml CH₂Cl₂ gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit HCl auf pH 1 angesäuert, um die Säure zu präzipitieren, abfiltriert und über Nacht an der Vakuumpumpe getrocknet. Nach Umkristallisierung mit Aceton konnte die 6-{{4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl}amino}-hexansäure (nachfolgend **Simazinhexansäure** bzw. **Simazinderivat** genannt) synthetisiert werden (s. Abb. 2.2).

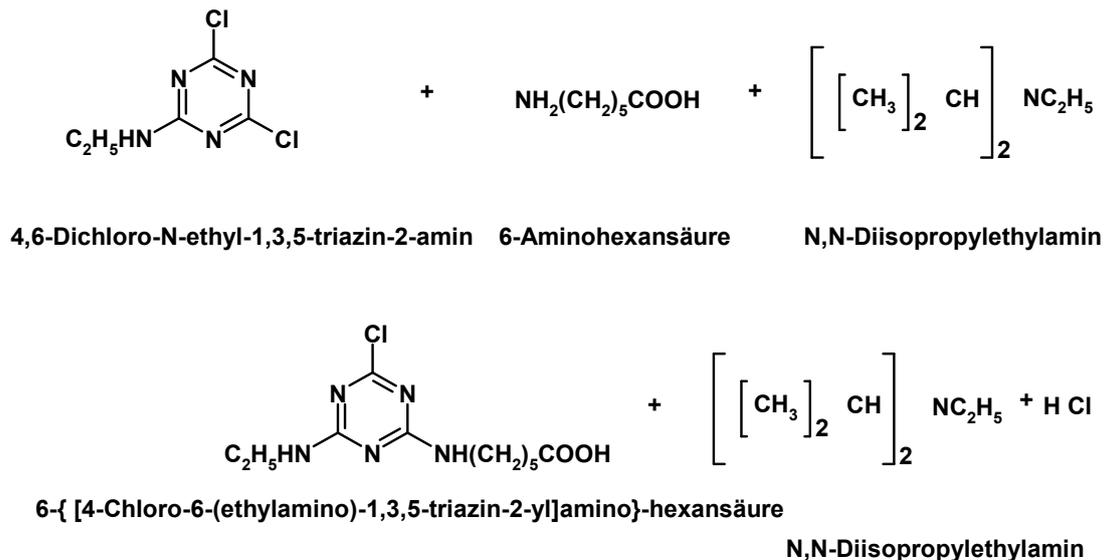


Abb. 2.2 : Zweiter Schritt der Synthese.

2.15.3 Dünnschichtchromatographie (DC)

Der Nachweis des 4,6-Dichloro-N-ethyl-1,3,5-triazin-2-amin am Ende des ersten Syntheseschritts sowie sein Verschwinden am Anfang des zweiten Schritts (s. Abschn. 2.15.1 und 2.15.2) erfolgte mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (DC).

Die Dünnschichtchromatographie wurde, wie bei Goodrow *et al.* (1990) beschrieben, auf einer mit 0,25 mm Silica-Gel beschichteten DC-Platte mit einer mobilen Phase von Tetrahydrofuran-säure-Ethylacetat-Hexan im Verhältnis 2:13:35 (v/v/v) durchgeführt. Der Nachweis der Substanzen erfolgte unter ultraviolettem Licht von 254 nm.

2.15.4 NMR-Spektroskopie der 6-{{4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl}amino}-hexansäure

Die NMR-spektroskopischen Messungen der 6-{{4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl}amino}-hexansäure wurden am Institut für Biochemie der Universität Bonn, Abteilung Prof. Famulok, von Herrn Stefan Jaeger durchgeführt. Es wurde das ¹H-Spektrum in deuteriertem Dimethylsulfoxid (DMSO) gemessen.

2.16 Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) – Biacore® 3000

2.16.1 Zur Theorie der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR)

Die Oberflächen-Plasmon-Resonanz (Surface Plasmon Resonance = SPR) ist ein physikalischer Prozess der auftreten kann, wenn planarpolarisiertes Licht unter den Bedingungen der totalen internen Reflexion einen Metallfilm trifft (BIAtechnology Handbook, 1998).

Das Phänomen der SPR wurde erstmals von Turbadar (1959) beobachtet, Otto (1968), Kretschmann und Raether (1968), Agarwal (1973) und Swalen (1986) erforschten und erklärten die Technik und zeigten die Vielseitigkeit der SPR auf.

2.16.1.1 Totale interne Reflexion

Wenn ein Lichtstrahl ein halbzirkuläres Prisma trifft, wird der Lichtstrahl an der Grenzschicht vom dichteren zum weniger dichten Medium zur Oberfläche des Prismas hin gebeugt.

Bei einem sogenannten „kritischen“ Einfallswinkel wird der einfallende Lichtstrahl in das Prisma zurück reflektiert, so dass kein Licht mehr in das weniger dichte Medium übertritt. Dies wird als totale interne Reflexion (TIR) bezeichnet. Obwohl dabei kein Licht das Prisma verlässt, breitet sich das elektrische Feld der Photonen über eine viertel Wellenlänge hinter die reflektierende Oberfläche hinaus aus.

2.16.1.2 Oberflächen-Plasmon

Wenn nun ein dünne Schicht eines Edelmetalls auf der reflektierenden Oberfläche des Prismas liegt, kann das elektrische Feld, das bei der TIR auftritt, die Metallfläche durchdringen und bei dem entsprechenden Energieniveau mit den freien Elektronen-Konstellationen in der Metallfläche interagieren. In diesem Fall werden die einfallenden Photonen absorbiert und in Oberflächen-Plasmone umgewandelt. Dieses Phänomen nennt man Oberflächen-Plasmon-Resonanz; dabei wird das Licht nicht mehr reflektiert, sondern ausgelöscht. Das Metall muss Leitungsbandelektronen besitzen, die fähig sind, mit dem einfallenden Licht bei einer geeigneten Wellenlänge in Resonanz zu treten (Katz, 2003). Metalle, die diesen Ansprüchen genügen, sind Silber, Gold, Kupfer, Aluminium, Natrium und Indium. Von diesen Metallen ist Indium zu teuer und Natrium zu reaktiv, während Kupfer und Aluminium in ihrer SPR-Antwort zu breit sind und Silber zu oxidativ ist. In den meisten Fällen wird, so auch in der Biacore-Technologie, Gold verwendet, da es gegen Oxidationen und Lösungen, die bei biochemischen Messungen verwendet werden, chemisch inert, aber kompatibel mit vielen chemischen Modifizierungssystemen ist. Zusätzlich bietet Gold ein

SPR-Signal bei akzeptablen Kombinationen des Winkels des reflektierten Lichtes und der Wellenlänge. Die Dicke der Goldschicht sollte bei ca. 50 nm liegen, da die Auslöschung des reflektierten Lichts oberhalb dieses Optimums zu flach und unterhalb dieses Optimums zu breit wird (Nagata und Handa, 2000).

Bei dem Ereignis der Resonanz wird die Energie des einfallenden Lichtstrahls in Elektronendichtewellen in der Goldschicht konvertiert. Wenn also die Quantenenergie der Photonen passend ist, werden die Photonen in Plasmone umgewandelt, was zu einer Auslöschung des reflektierten Lichts führt. Die Resonanz tritt nur auf, wenn die Bewegungsenergie der einfallenden Photonen gleich der Bewegungsenergie der Plasmone ist. Die Bewegungsenergie der Photonen und Plasmone kann durch eine Vektor-Funktion mit den zwei Komponenten „Betrag“ (Magnitude) und „Richtung“ beschrieben werden. Der relative Betrag der Komponenten ändert sich, wenn sich der Winkel oder die Wellenlänge des einfallenden Lichtstrahls ändert. Da die Plasmone jedoch auf die planare Ebene des Goldfilms begrenzt sind, ist für die SPR nur die Vektor-Komponente parallel zur Oberfläche entscheidend. Daher tritt Resonanz bei dem Winkel des einfallenden Lichtstrahls auf, bei dem die planar-parallele Vektor-Komponente der Photonen der Bewegungsenergie der Plasmone gleicht. Da bei der Biacore-Technologie mit einer festen Wellenlänge des Lichtes gearbeitet wird, wird dort nur der Resonanzwinkel bestimmt.

2.16.1.3 Evaneszente Wellen

Wie in der TIR die reflektierten Photonen ein elektrisches Feld auf der gegenüberliegenden Seite der Grenzschicht bilden, so erzeugen die Plasmone ein vergleichbares Feld, das sich in das Medium auf beiden Seiten des Metallfilms ausbreitet. Dieses Feld nennt man evaneszentes Feld, weil die Amplitude der Welle exponentiell mit zunehmender Distanz von der Grenzschicht abnimmt (Nagata und Handa, 2000). Die Ausbreitungstiefe der evaneszenten Welle, die für SPR-Messungen verwendet werden kann, liegt innerhalb von ~ 300 nm von der Sensor-Oberfläche (Merwe, 2003). Gleichungen, die die Bewegung von Licht in einem Medium beschreiben, beinhalten den refraktiven Index als Term für die Eigenschaft des Mediums. Man sieht Refraktion von Licht, weil die Geschwindigkeit der Photonen in verschiedenen Medien differiert. In der gleichen Art und Weise ändert sich die Geschwindigkeit der Plasmone mit den Eigenschaften des Mediums auf beiden Seiten der leitenden Schicht. Wenn sich also die Analytkonzentration an der Sensoroberfläche ändert (und damit der refraktive Index), wird dadurch die Geschwindigkeit der Oberflächenplasmone beeinflusst und der Winkel des einfallenden Lichts, bei dem Resonanz auftritt, ändert sich.

Dieser Typ der SPR wird als Resonanzwinkel-SPR bezeichnet und ist die im Biacore® 3000 (Biacore AB, Uppsala, S) verwendete Technologie (BIAtechnology Handbook, 1998).

Damit ist der SPR-Winkel abhängig von den Eigenschaften des Metallfilms, der Wellenlänge des einfallenden Lichts und dem refraktiven Index des Mediums auf beiden Seiten des Metallfilms. Da in der Biacore-Technologie der Metallfilm, die Lichtwellenlänge und die Temperatur konstant gehalten werden, ist das SPR-Signal direkt abhängig von der Änderung des refraktiven Index des Mediums an der Sensorseite der SPR-Oberfläche. Zusätzlich sollte wie in der Biacore-Technologie monochromatisches und p-polarisiertes Licht verwendet werden, um eine scharfe Auslöschung zu erhalten (Nagata und Handa, 2000).

2.16.1.4 Biomolekulare Interaktionen

Da biomolekulare Interaktionen an der Sensoroberfläche zu einer Konzentrationsänderung an der Oberfläche führen und damit zu einer Änderung des refraktiven Indexes, der in Form einer Änderung des Resonanzwinkels gemessen wird, ist es mit der SPR-Technologie möglich, markierungsfreie Bindungsstudien in Echtzeit durchzuführen (s. Abb. 2.3).

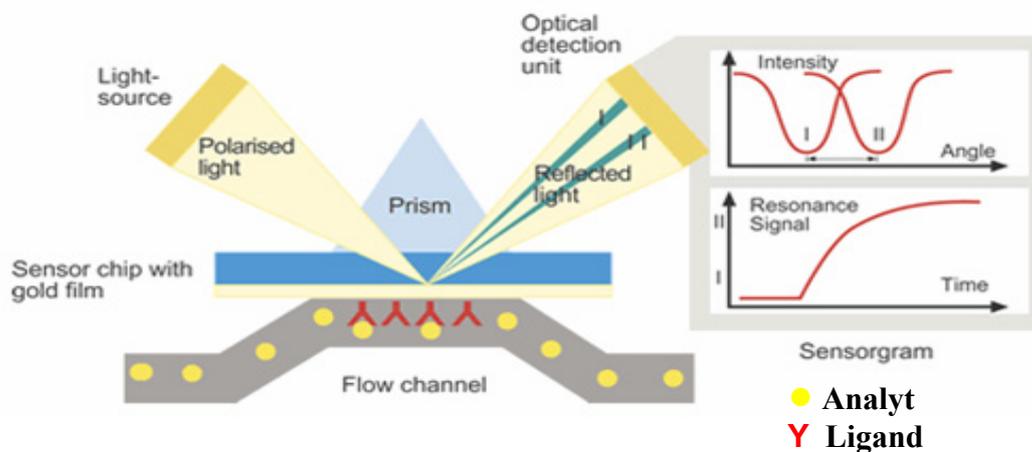


Abb. 2.3 : SPR Detektionssystem. I und II stellen die Änderung des Resonanzwinkels bei Bindung eines Analyten an der mit Liganden modifizierten Oberfläche dar (s. kleines Bild rechts oben). Das kleine Bild rechts unten zeigt das dazugehörige Bindungssignal in Form eines Sensorgramms.

Da die Änderung des refraktiven Indexes an der Sensoroberfläche linear zu der Menge gebundener Moleküle ist (Stenberg *et al.*, 1991; Quinn *et al.*, 2000), kann damit die Menge gebundener Moleküle bestimmt werden. In der Biacore-Technologie wird die Winkeländerung des ausgelöschten Lichtstrahls in die Einheit RU = **R**esonance **U**nits umgerechnet, wobei bei dem in dieser Arbeit verwendeten Biacore® 3000 (Biacore AB, Uppsala, S) 1.000 RU einer Winkeländerung von $0,1^\circ$ entsprechen (Biacore® 3000 Instrument Handbook, 2003). Dabei sind 1.000 RU einer Massenänderung von 1 ng/mm^2 in

der Proteinkonzentration an der Sensorchipoberfläche gleichzusetzen (Stenberg *et al.*, 1991; BIAapplications Handbook, 1998), was ca. 6 mg/ml Proteinkonzentration in der Lösung bzw. einer Volumenkonzentration von 10 mg/ml in der Dextranmatrix bei einem CM5-Chip entspricht (BIAapplications Handbook, 1998).

Das in dieser Arbeit verwendete Biacore® 3000 Messgerät kann z. B. in einem Bereich des refraktiven Indexes von 1,33-1,4 messen, was 0-70.000 RU entspricht (BIAapplications Handbook, 1998; Markey, 1999; Biacore® 3000 Instrument Handbook, 2003; Marquart, 2005).

Die SPR ist damit ein Massendetektor, der keine Markierung der Bindepartner benötigt und auch in trüben, gefärbten oder milchigen Flüssigkeiten Moleküle detektieren kann. Moleküle können im nativen Zustand untersucht werden, so dass eine Messung ihres Verhaltens und ihrer Aktivität wie *in vivo* möglich ist (Biacore Technology Note 1, 2001).

2.16.2 Biacore-Technologie/Biacore® 3000

Die real-time Biomolecular Interaction Analysis (BIA) macht sich das Phänomen der Oberflächen-Plasmon-Resonanz zunutze. Biacore® verbindet in seiner Technologie die SPR mit einer Sensorchip-Technologie und einem Mikroflusssystem (s. Abb. 2.5). Abbildung 2.4 zeigt das in dieser Arbeit verwendete SPR-Messgerät Biacore® 3000 sowie einen CM5-Sensorchip.



Abb. 2.4 : Messgerät Biacore® 3000 und CM5-Chip. Quelle: Bilder mit freundlicher Genehmigung von Biacore AB.

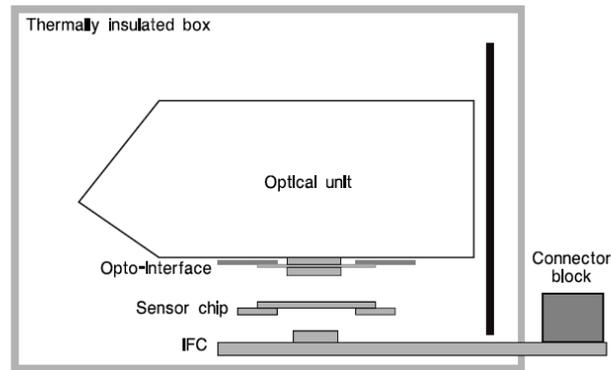


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Detektionseinheit des Biacore® 3000. Quelle: Biacore® 3000 Instrument Handbook, 2003. Bild mit freundlicher Genehmigung von Biacore AB.

In Abbildung 2.6 ist ein typisches Sensorgramm einer Interaktion mit Assoziationsphase bei der Bindung des Analyten an den an der Chipoberfläche immobilisierten Liganden und mit Dissoziationsphase mit anschließender Regeneration der Chipoberfläche dargestellt. In der Biacore®-Terminologie wird der an der Sensoroberfläche immobilisierte Interaktionspartner Ligand genannt und der Reaktionspartner, der frei in der Lösung vorliegt, wird als Analyt bezeichnet.

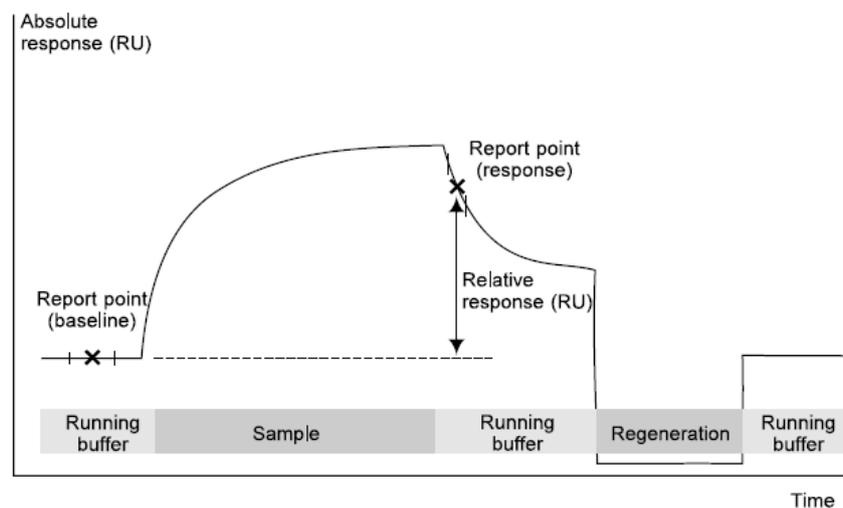


Abb. 2.6: Schematische Darstellung eines Sensorgramms mit Assoziationsphase, Dissoziationsphase und Regeneration. Quelle: Biacore® Sensor Surface Handbook, 2003. Bild mit freundlicher Genehmigung von Biacore AB.

Mit dem Biacore® 3000 (s. Abb. 2.4) ist es möglich, Moleküle bis zu einer Größe von unter 200 Da nachzuweisen (Biacore® 3000 Instrument Handbook, 2003). Zusätzlich besitzt das Biacore® 3000 eine Biacore-MS-Kopplung, das so genannte Biacore analyte recovery, bei dem an die Sensoroberfläche gebundene Moleküle wieder eluiert und direkt auf eine MALDI-Platte abgesetzt werden können (s. Abschn. 2.17) (Sönksen *et al.*, 1998).

2.16.2.1 Sensorchip-Technologie

Der Sensorchip (s. Abb. 2.4) stellt den Signaltransducer in der real-time-BIA dar. Der Sensorchip besteht aus einem Glasplättchen, das auf einer Seite mit einer 50 nm dicken Schicht aus Gold bedeckt ist. Die Goldoberfläche ist je nach Chiptyp verschieden derivatisiert.

Die Biacore®-SPR-Technologie verfügt über austauschbare Sensorchips mit unterschiedlich modifizierten Oberflächen und differierenden chemischen Kopplungsmöglichkeiten. In den meisten Biacore®-Experimenten werden die Liganden an eine carboxymethylierte Dextranmatrix angebunden, die die Sensorchipoberfläche bedeckt. Der am häufigsten verwendete und auch in dieser Arbeit eingesetzte CM5-Chip (Biacore AB, Uppsala, S) ist mit einer 100 nm langen carboxymethylierten Dextranschicht modifiziert (Löfås und Johnsson, 1990). Dieses Dextranhydrogel schafft eine hydrophile Umgebung für die gebundenen Biomoleküle (Liganden), um sie für die Interaktionsstudien in einem nativen Zustand zu erhalten. Die Dextranschicht besitzt ungefähr eine Carboxylgruppe pro Glucoserest (BIAtechnology Handbook, 1998).

Neben der chemischen Anbindung der Liganden an die Carboxylgruppen können über diese aber auch die Liganden an der Oberfläche über ihre Ladung ankonzentriert werden. Dadurch wird der Immobilisierungsprozess beschleunigt und durch diesen Ankonzentrierungsprozess kann die Immobilisierung bei wesentlich geringeren Konzentrationen des Liganden erfolgen. Bei dem ebenfalls in dieser Arbeit verwendeten C1-Chip (Biacore AB, Uppsala, S) handelt es sich um einen Sensorchip mit einer carboxymethylierten Goldschicht. Die Dextranmatrix erhöht die Liganden-Immobilisierungskapazität der Chipoberfläche von typischerweise 1-5 ng/mm² beim unbehandelten C1-Chip auf bis zu 50 ng/mm² beim CM5-Chip.

2.16.2.2 Mikroflusssystem/Integrated μ -Fluidic Cartridge (IFC)

Die Funktion der Integrated μ -Fluidic Cartridge (IFC, Mikroflusssystem) (s. Abb. 2.7) ist die Kontrolle der Zuleitung von Flüssigkeit zu der Sensorchipoberfläche. Das Mikroflusssystem besteht aus einer Serie von Präzisionskanälen in einer Hart-Polymerplatte aus Silikon, die die Probenloops und Mikroflussskanäle für die Puffer- und Probenzuleitung formen. Die Einheit wird durch 16 verschiedene, in die IFC eingebaute und pneumatisch gesteuerte Diaphragma-Ventile gesteuert. Durch den miniaturisierten Aufbau des Microflusssystems können sehr geringe Probenvolumina gemessen werden; es können Volumina von 5-750 μ l injiziert werden.

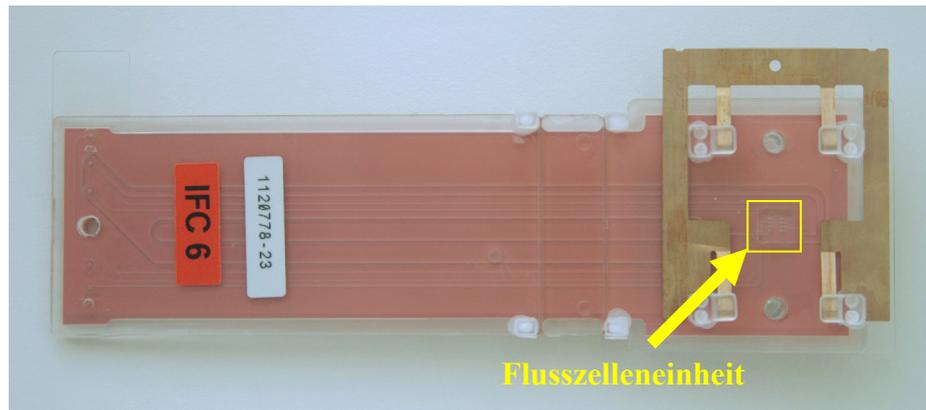


Abb. 2.7: Foto einer Integrated μ -Fluidic Cartridge (IFC). Rechts Flusszelleneinheit, auf die der Sensorchip gepresst („gedockt“) wird.

Über das Mikroflusssystem wird kontinuierlich Puffer bzw. die Probe über die Sensorchipoberfläche geleitet; durch den Aufbau kann die zu untersuchende Analytlösung schnell gegen Puffer ausgetauscht werden. Mittels des kontinuierlichen Flusssystems wird der Kontakt der Sensoroberfläche mit Luft verhindert, so dass die Denaturierung der Liganden durch Luft unterbunden und die Konzentration an freien Analyten für die Dauer des Bindungsexperiment konstant gehalten wird (Biacore® 3000 Instrument Handbook, 2003).

Das Biacore® 3000 besitzt vier Flusszellen, mit denen parallele Messungen durchgeführt werden können (s. Abb. 2.8). Die Flusszellen können individuell oder in Reihe geschaltet und gleichzeitig aufgenommen werden.

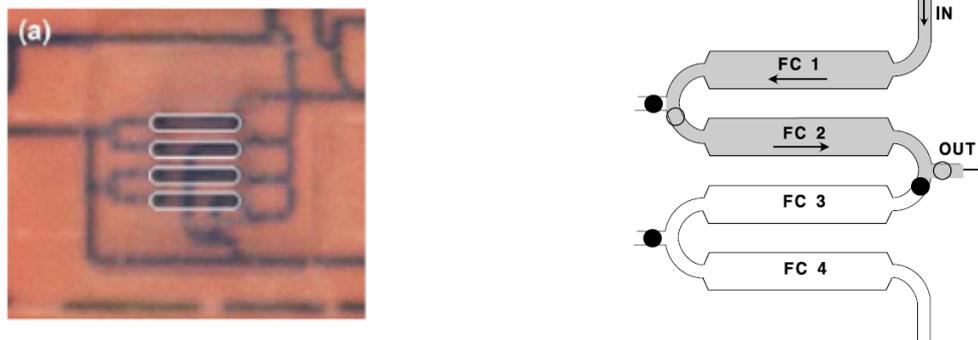


Abb. 2.8 : Links: Flusszellen des Biacore® 2000 (entsprechen in der Anordnung dem Biacore® 3000). Zur Visualisierung wurde schwarze Farbe in das Flußsystem gespritzt. Die Mikrokanäle des Mikroflusssystems, die die Probe zu den Flusszellen transportieren, sind im Hintergrund zu sehen. Quelle: Rich und Myszka, 2004.

Rechts: Schematische Darstellung der Flusszellen des Biacore® 3000. Quelle: Biacore® 3000 Instrument Handbook, 2003. Bild mit freundlicher Genehmigung von Biacore AB.

Eine Flusszelle des Biacore® 3000 besitzt eine Dimension von 2,1 mm x 0,5 mm x 0,02 mm und damit ein Volumen von $0,021 \text{ mm}^3$ bzw. 21 nl. Die Flusszellen werden direkt auf der IFC durch das Pressen („Docken“) des Sensorchips an den IFC-Flusszellenblock geformt (s. Abb. 2.5 und 2.9). Der Flusszellenblock auf der IFC besitzt vier Vertiefungen, die in die Oberfläche der IFC eingelassen sind (s. Abb. 2.9), dadurch werden vier separate Flusszellen mit der

Sensorchipoberfläche als eine Wand gebildet. Jede Vertiefung hat ihren eigenen Zufluss- und Abflusskanal sowie Kontrollventile in der IFC.

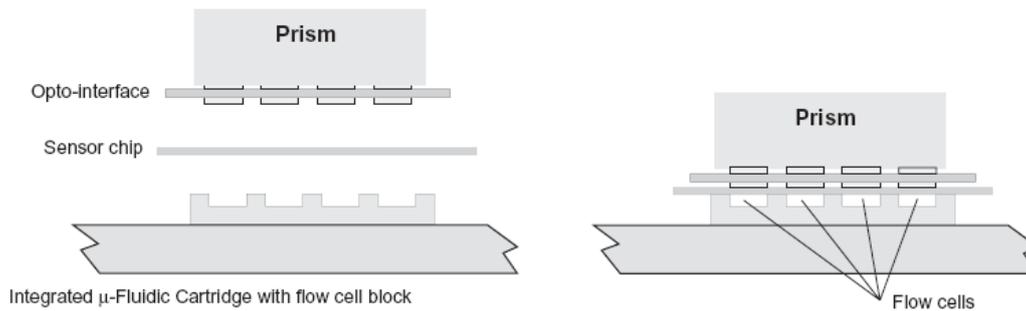


Abb. 2.9 : Schematische Darstellung der Formung der Flusszellen auf dem Sensorchip. Präzisionskanäle in der IFC bilden vier Flusszellen auf der Sensorchipoberfläche, indem der Sensorchip mit dem opto-interface und dem Prisma auf die IFC abgesenkt („gedockt“) wird. Quelle: Biacore® 3000 Instrument Handbook, 2003. Bilder mit freundlicher Genehmigung von Biacore AB.

Der Aufbau der IFC gestattet Einzel- wie auch Multichannel-Analysen, die Flusszellen 1 und 3 können dabei als online-Referenzzellen verwendet werden, die eine automatische Blank-Subtraktion der Daten in der Software (Biacore® 3000 Control Software 4.1., Biacore AB, Uppsala, S) ermöglichen. Dabei ist es möglich, Bindungsinteraktionen von drei Messzellen und einer Referenzzelle simultan zu erfassen. Dadurch können gleichzeitig bis zu drei verschiedene Liganden in den Messzellen immobilisiert werden, wodurch eine Multichannel-Analyse in einem Messschritt realisierbar wird. Die Zuführung der Probe auf jede Messfläche in Serie erlaubt eine online-Referenz-Subtraktion und erhöht damit die Datenqualität (Myszka, 1999a; Rich und Myszka, 2000). Das so genannte „Referencing“, d. h. der Abzug der Referenz-Flusszelle von der Messzelle, ist dabei eine grundlegende Erfordernis in der SPR-Technologie, da es die Messergebnisse im Hinblick auf massenabhängige Änderungen des refraktiven Indexes und nicht-spezifische Bindung korrigiert.

Injektionskommandos aktivieren eine Sequenz von Aktionen wie das Aufnehmen der Proben aus dem Vial durch den Autosampler, die Zuleitung der benötigten Menge an Probe zu der/den entsprechenden Flusszelle/n und das Spülen der IFC mit Puffer zwischen den Injektionen bzw. das Durchführen von automatischen Waschzyklen (BIAtechnology Handbook, 1998; Biacore Technology, 2001; Biacore® 3000 Instrument Handbook, 2003).

In Zusammenhang mit dem Autosampler können mit dem Biacore® 3000 bis zu 768 Proben in einem automatischen Ablauf gemessen werden (BIAtechnology Handbook, 1998; Biacore Technology, 2001; Biacore® 3000 Instrument Handbook, 2003).

2.16.2.3 Optisches System

Die Lichtquelle in den Biacore-Systemen ist eine nahe dem Infrarotlicht emittierende Diode. Das Licht wird auf dem Sensorchip in einem keilförmigen Lichtstrahl fokussiert, was einen festen Bereich an Einfallswinkeln ergibt. Die SPR-Antwort wird durch ein festes Array von Licht-sensitiven Dioden aufgenommen, die den ganzen Ausschnitt des reflektierten Lichts abdecken. Durch Computerinterpolation wird automatisch der SPR-Winkel berechnet (BIAtechnology Handbook, 1998).

Der Detektor, der im Biacore® 3000 verwendet wird, hat einen weiteren dynamischen Bereich als der des Biacore® 1000- oder Biacore® 2000-Gerätes (Biacore® 3000 Instrument Handbook, 2003). Dieser vergrößerte Detektorbereich erlaubt die Immobilisierung von höheren Dichten an Liganden und ermöglicht die Untersuchung von Bindungsreaktionen in Medien mit höheren refraktiven Indizes (Rich und Myszka, 2004). Dies ist neben der erhöhten Sensitivität des Biacore® 3000 ein Grund, warum kleine Moleküle (< 300 Da) gemessen werden können; diese Moleküle sind, da sie oft nicht wasserlöslich sind, in Puffern mit hohem refraktivem Index (z. B. DMSO) gelöst.

2.16.2.4 Biacore® 3000 Control Software

Die Biacore-Messungen wurden mit der Biacore® 3000 Control Software 4.0.1. später 4.1. (Biacore AB, Uppsala, S), teilweise programmgesteuert, durchgeführt.

2.16.2.5 BIAevaluation Software

Zur Auswertung der im Biacore® 3000 aufgenommenen Daten wurde die BIAevaluation Software 4.1. (Biacore AB, Uppsala, S) verwandt, mit der die kinetische Auswertung und Affinitätsauswertung der Bindungsexperimente durchgeführt wurde (s. Abschn. 3.4.3). Ebenso erfolgte mit der Software die Auswertung der Small-molecules-Experimente (s. Abschn. 3.6).

Für die Auswertung der Affinitäten wurde eine 4-Parameter-Gleichung angewandt, nach folgender Gleichung:

$$\text{Antwort} = R_{hi} - \frac{R_{hi} - R_{lo}}{1 + (\text{Conc}/A1)^{A2}}$$

R_{hi} = Antwort bei unendlicher Konzentration, R_{lo} = Antwort bei der 0-Konzentration, Conc = Konzentration des Analyten, A1 = „Fitting“-Konstante, A2 = „Fitting“-Konstante.

Für die Anpassung der Kurven mit dem 1:1-Langmuir-Modell mit driftender Basislinie wurden folgende Raten-Gleichungen angewandt:

$$\begin{aligned} A &= \text{Conc} \\ L[0] &= R_{\max} \\ \frac{dL}{dt} &= - [k_a * A * L - k_d * AL] \\ AL[0] &= 0 \\ \frac{dAL}{dt} &= [k_a * A * L - k_d * AL] \\ \text{Totale Antwort:} \\ AL + RI + [\text{Drift} * (t - t_{\text{On}})] \end{aligned}$$

t_{On} = Startzeit für die Probeninjektion (s), Drift = Basislinien Drift (RU/s), Conc = Analytkonzentration (M), t = Zeit (s)
 R_{\max} = maximale Analyt-Bindungskapazität (RU), k_a = Assoziations-Ratenkonstante, k_d = Dissoziations-Ratenkonstante
 A = Analyt, L = Ligand, AL = Liganden-Analyt-Komplex, RI = Beitrag der Masse am refraktiven Index (RU).

2.16.3 SPR-Messungen mit dem Anti-D1-Antikörper-Chip

2.16.3.1 Aminkopplung eines Anti-D1-Antikörpers

Zum Nachweis des D1-Proteins in PS-II-Proteinkomplex-Extrakten bzw. FPLC-Fractionen wurde ein polyklonaler Anti-D1-Antikörper (Anti-D1-AK) (AS 02-017, Agrisera, Vännäs, S) an einen Biacore® CM5-Chip (Biacore AB, Uppsala, S) gekoppelt. Bei diesem Antikörper handelte es sich um einen IgY-Antikörper aus Hühnereiern.

Zur direkten Immobilisierung der Antikörper-Liganden an die Sensoroberfläche wurde die kovalente Aminkopplungsmethode verwandt. Als Sensorchip kam der Chiptyp CM5 mit einer 100 nm langen carboxymethylierten Dextranmatrix zum Einsatz. Der gesamte Versuchsablauf wurde bei einer Flussrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchgeführt.

Durch eine 7-minütige Injektion eines Gemisches aus 0,2 M 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-Hydrochlorid (EDC) und 0,05 M N-Hydroxysuccinimid (NHS) wurden die Carboxylgruppen an der Dextranmatrix aktiviert, um reaktive N-Hydroxysuccinimid-Ester herzustellen (s. Abb. 2.10). Bei der nachfolgenden 15-minütigen Injektion der Antikörper-Liganden reagierten diese Ester dann spontan mit den Aminogruppen der Liganden und bildeten kovalente Bindungen an die Chipoberfläche. Im Anschluss wurden die reaktiven Succinimidgruppen, die nicht mit Aminogruppen reagiert hatten, durch eine 7-minütige Injektion von 1 M Ethanolaminhydrochlorid (pH 8,5) deaktiviert. Parallel dazu wurde eine Flusszelle als Blankzelle behandelt, wobei eine Aktivierung mit EDC und NHS sowie eine anschließende Deaktivierung mit Ethanolaminhydrochlorid durchgeführt wurde, um eine völlig gleichbehandelte Referenzmessfläche zu erhalten.

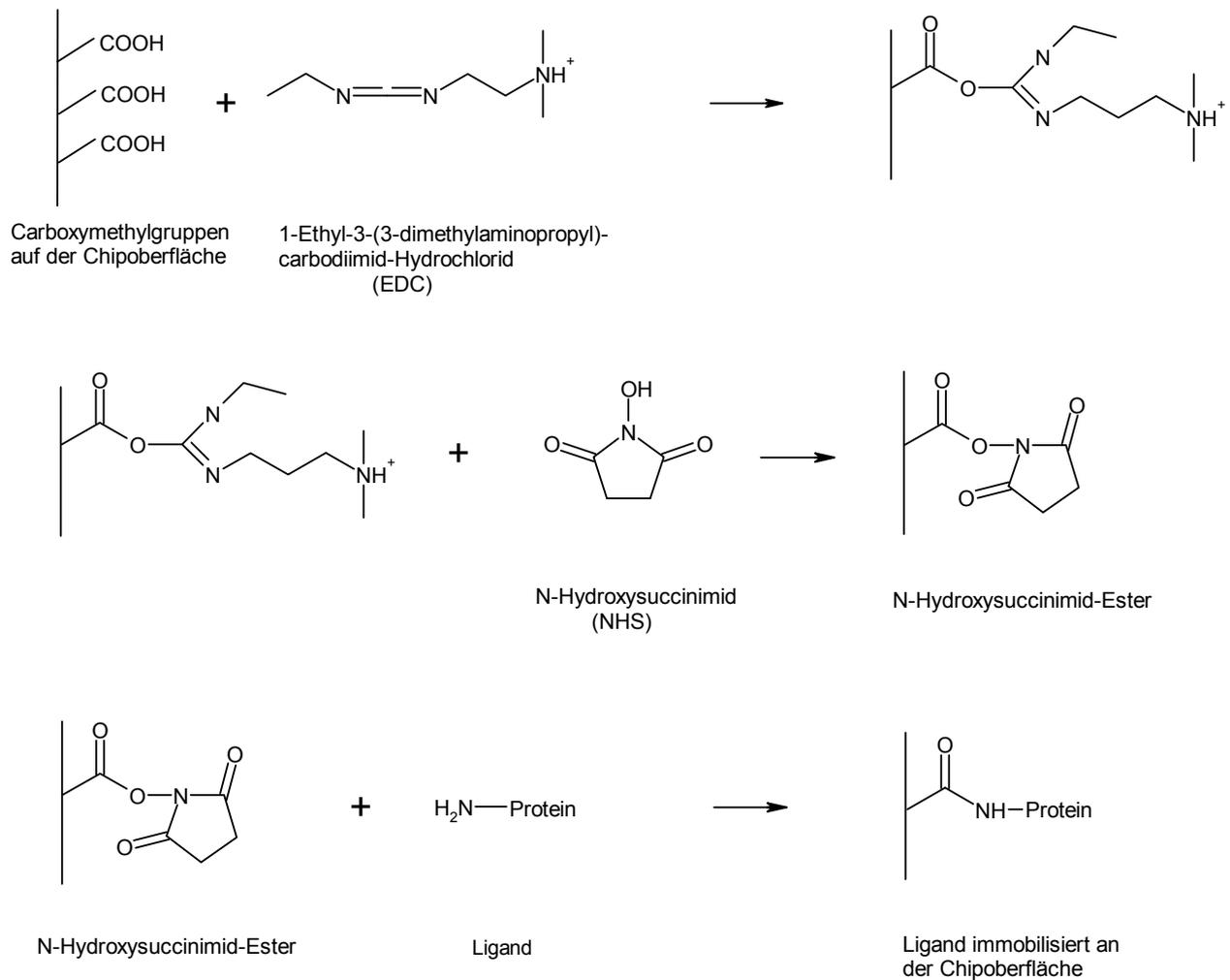


Abb. 2.10 : Chemischer Reaktionsablauf der Aminkopplung.

2.16.3.2 Präkonzentrierung der Liganden an der Chipoberfläche

Die Antikörper (AK) wurden zuvor an der Chipoberfläche präkonzentriert, um den optimalen Kopplungs-pH-Wert zu ermitteln und damit die Menge der zu immobilisierenden Liganden zu verringern. Generell gilt, dass Liganden mit einem pH-Wert unterhalb ihres isoelektrischen Punktes (pI) immobilisiert werden sollten, da sie dann eine positive Ladung aufweisen und von der negativ geladenen Dextranschicht elektrostatisch angezogen werden. Solange der Ligand eine positive Ladung aufweist ($\text{pH} \ll \text{pI}$) steigt die Präkonzentrierungsrate mit zunehmender Ligandenkonzentration, erreicht aber ein Maximum schon bei sehr geringen Konzentrationen von 20-100 $\mu\text{g/ml}$. Üblicherweise immobilisiert man bei einer Ligandenkonzentration von 10-200 $\mu\text{g/ml}$. Die Anti-D1-Antikörper wurden in dieser Arbeit mit einer Konzentration von ca. 50-70 $\mu\text{g/ml}$ mit einem 10 mM Acetat-Puffer in einem pH-Bereich von ca. 4,5 bis 5,5 immobilisiert.

2.16.3.3 Untersuchung von FPLC-Fraktionen auf die Anwesenheit von D1-Protein über den SPR-Anti-D1-AK-Chip

Zur Untersuchung von FPLC-Fraktionen auf den Nachweis von D1-Protein wurden die nach Abschnitt 2.9 lyophilisierten FPLC-Fraktionen von den PS-II-Extrakten PS II 53 BL, PS II 54 KL und PS II 55 E1 (ursprüngliches Volumen vor der Lyophilisation 500 µl) in je 85 µl HBS-EP-Puffer (s. Tab. 2.21) aufgenommen, durchmischt und 1 min bei 2.000 g zentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen. Die FPLC-Fraktionen wurden damit um den Faktor 1:5,88 konzentriert.

Die lyophilisierten FPLC-Fraktionen der PS-II-Extrakte PS II 47 E1L, PS II 48 B, PS II 49 BL und PS II 50 E1L (ursprüngliches Volumen vor der Lyophilisation 300 µl) wurden in je 85-100 µl HBS-EP-Puffer (s. Tab. 2.21) aufgenommen, vermischt und 1 min bei 2000 g zentrifugiert. Dies entsprach einer Konzentrierung um den Faktor 1:3,5 bis 1:3.

Die über Vakuumzentrifugation getrockneten (s. Abschn. 2.10.1) FPLC-Fraktionen (ursprüngliches Volumen vor der Vakuumzentrifugation 500 µl) wurden in je 150 µl HBS-EP-Puffer (s. Tab. 2.21) aufgenommen und ebenfalls gemischt. Die FPLC-Fraktionen wurden in diesem Falle um den Faktor 1:3,33 konzentriert.

0,01 M	HEPES pH 7,4
0,15 M	NaCl
3 mM	EDTA
0,005 % (v/v)	P20

Tab. 2.21 : Zusammensetzung des HBS-EP-Puffers.

Unmittelbar darauf wurden die so aufbereiteten Fraktionen mit bzw. ohne Rackkühlung von 4 °C programmgesteuert jeweils 3 bzw. 5 min über den mit Anti-D1-Antikörpern immobilisierten Chip injiziert, mit einer anschließenden Dissoziationszeit von 3 bzw. 5 min. Es wurde bei einer Flussrate von 10 µl/min in einzelnen Zyklen für jede Injektion gemessen. Auf die Anwesenheit von D1-Protein wurden jeweils die gesamten gesammelten FPLC-Fraktionen eines Laufes im Biacore® 3000 untersucht. Zusätzlich wurden zwischen den Probeninjektionen Blankinjektionen mit HPS-EP-Puffer durchgeführt. Vom SPR-Signal der Messflusszelle mit immobilisierten Anti-D1-Antikörpern wurde softwareintern (Biacore® 3000 Control Software, Biacore AB, Uppsala, S) automatisch das Messsignal der Referenz-Flusszelle abgezogen. Dadurch wurden eventuell vorhandene unspezifische Bindungen des Analyten an die Chipoberfläche herausgerechnet. Zusätzlich wurde ein so genanntes „double referencing“ angewandt, wobei eine Blankinjektion mit dem für die Messungen verwendeten Puffer zusätzlich von der Probeninjektion abgezogen wurde.

2.16.4 SPR-Messungen mit dem Simazinhexansäure-Chip

2.16.4.1 Oberflächenthioalkopplung der 6-{[4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl]amino}-hexansäure an einen C1-Chip

Die Oberflächenthioalkopplung der 6-{[4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl]amino}-hexansäure (Simazinhexansäure/Simazinderivat) wurde in Abwandlung nach Schlecht *et al.* (2002) durchgeführt. Bei der Oberflächenthioalkopplung wird eine aktive Disulfidbrücke in den Liganden eingeführt und mit Thiolgruppen ausgetauscht, die auf der Sensorchipoberfläche eingeführt wurden.

Die Immobilisierung der 6-{[4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl]amino}-hexansäure wurde an einem C1-Chip (Biacore, Uppsala, S) durchgeführt.

2.16.4.1.1 Modifizierung des Simazinhexansäure-Liganden

Im ersten Schritt wurde der Ligand, die 6-{[4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl]amino}-hexansäure, nach Schlecht *et al.* (2002) modifiziert. Um eine reaktive Disulfidbrücke in den Liganden einzuführen, wurden 50 µl 1,81 µM 6-{[4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl]amino}-hexansäure (gelöst in 10 mM PBS-Puffer, pH 7,4) mit 50 µl NHS (0,1 M), 50 µl EDC (0,4 M) und 50 µl 45 mM 2-(2-Pyridinyldithio)-ethanamin (PDEA) (gelöst in 0,1 M MES-Puffer, pH 5,0) für 1 h unter Lichtabschluss auf Eis inkubiert (s. Abb. 2.11).

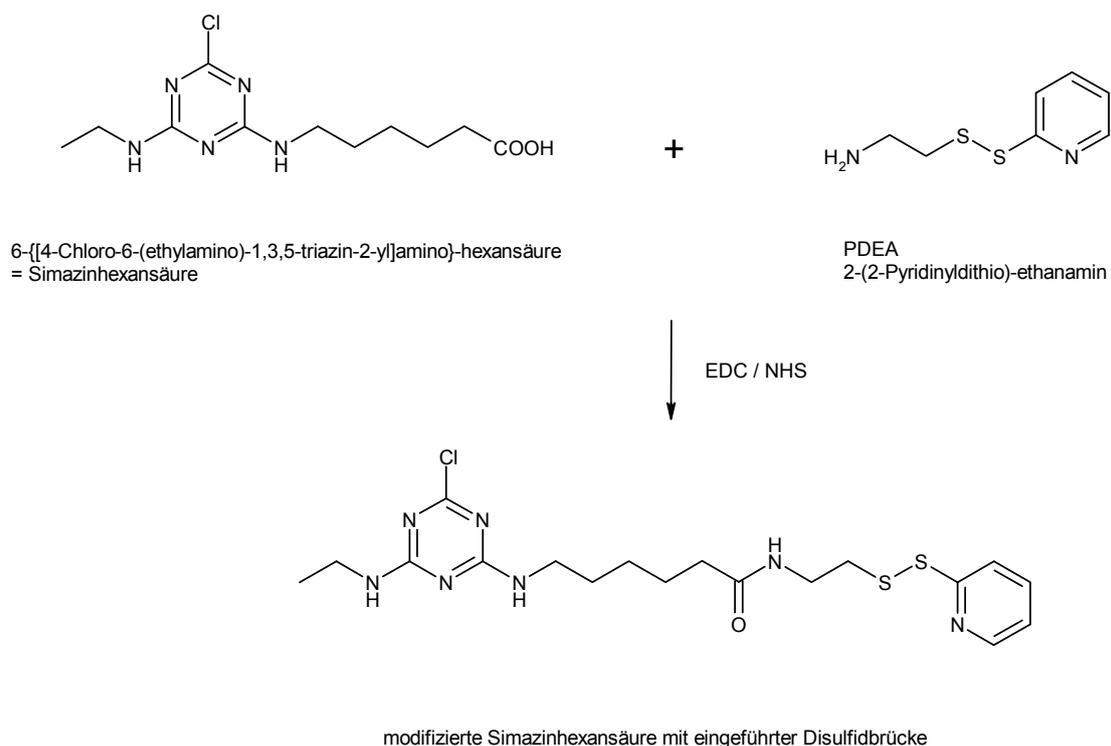


Abb. 2.11 : Modifizierung des Simazinhexansäure-Liganden.

2.16.4.1.2 Modifizierung der Chipoberfläche

Alle Experimente wurden bei 25 °C und bei einer Flussrate von 5 µl/min durchgeführt. Zuerst wurde der C1-Sensorchip mit BIA normalizing solution (Biacore, Uppsala, S) „normalisiert“ und anschließend das Flusssystem mit HBS-EP-Puffer (s. Tab. 2.21) gespült („Prime“). Die Chipoberfläche wurde dann durch eine 2-minütige Injektion von 0,2 M EDC und 0,05 M NHS aktiviert, um einen reaktiven NHS-Ester einzuführen. Daran schloss sich eine 3-minütige Injektion von 40 mM Cystamindihydrochlorid (gelöst in 0,15 M Na-Borat-Puffer, pH 8,5) an, wobei der Ester spontan mit den Aminogruppen des Cystamins reagierte und dadurch Disulfidbrücken auf der Sensoroberfläche eingefügt wurden. Durch eine 3-minütige Injektion von 0,1 M Dithioerythritol (DTE) (gelöst in 0,15 M Na-Borat-Puffer, pH 8,5) wurden die Disulfidbrücken zu freien Thiolgruppen reduziert (s. Abb. 2.12).

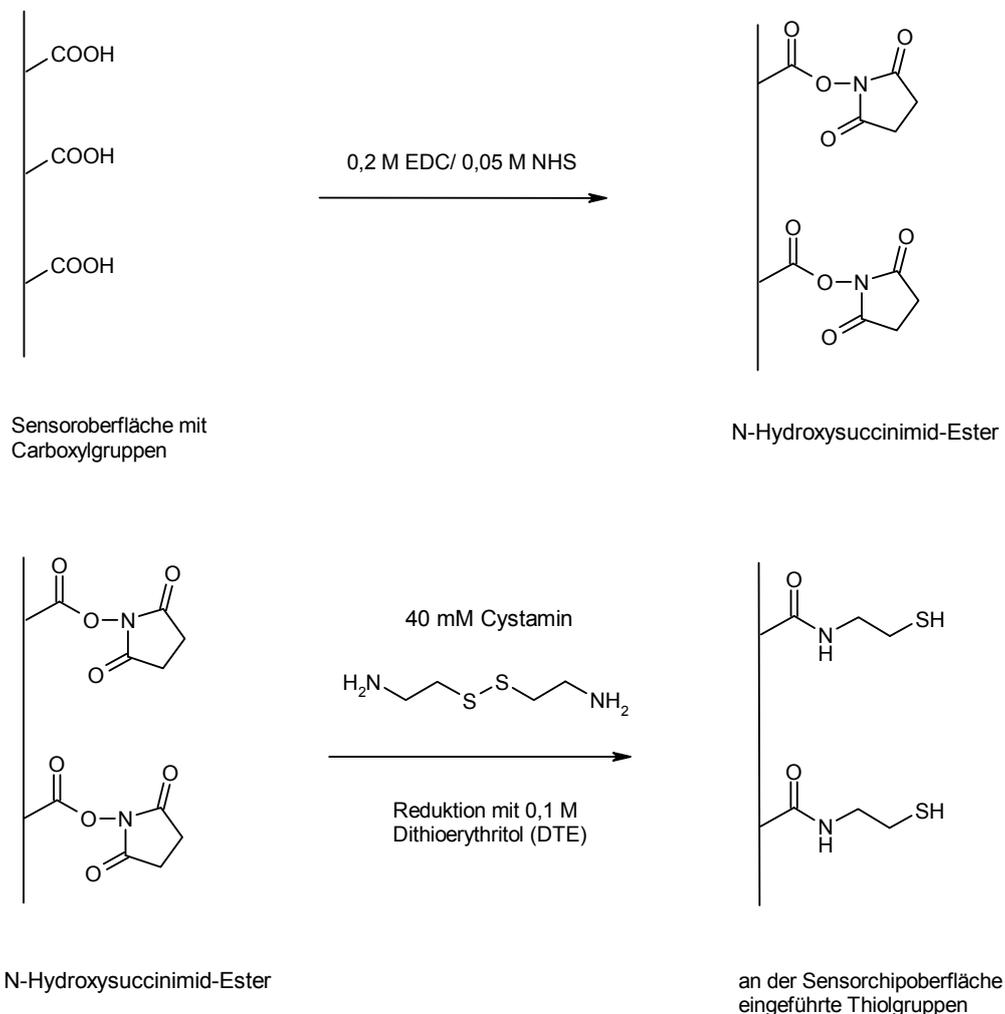


Abb. 2.12 : Modifizierung der Chipoberfläche. Einführung einer Thiolgruppe auf der Chipoberfläche.

2.16.4.1.3 Immobilisierung des Liganden an der Chipoberfläche

Um den modifizierten Liganden zu immobilisieren, wurde die in Abschnitt 2.16.4.1.1 angegebene Lösung 7 min über die modifizierte Chipoberfläche injiziert. Dabei wurden die Thiopyridon-Gruppen der 6-{[4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl]amino}-hexansäure/PDEA-Konjugate freigesetzt und neue Disulfidbrücken zwischen den Thiolgruppen auf der Oberfläche und den Thiolen der 6-{[4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl]amino}-hexansäure bzw. des freien PDEA gebildet (s. Abb. 2.13).

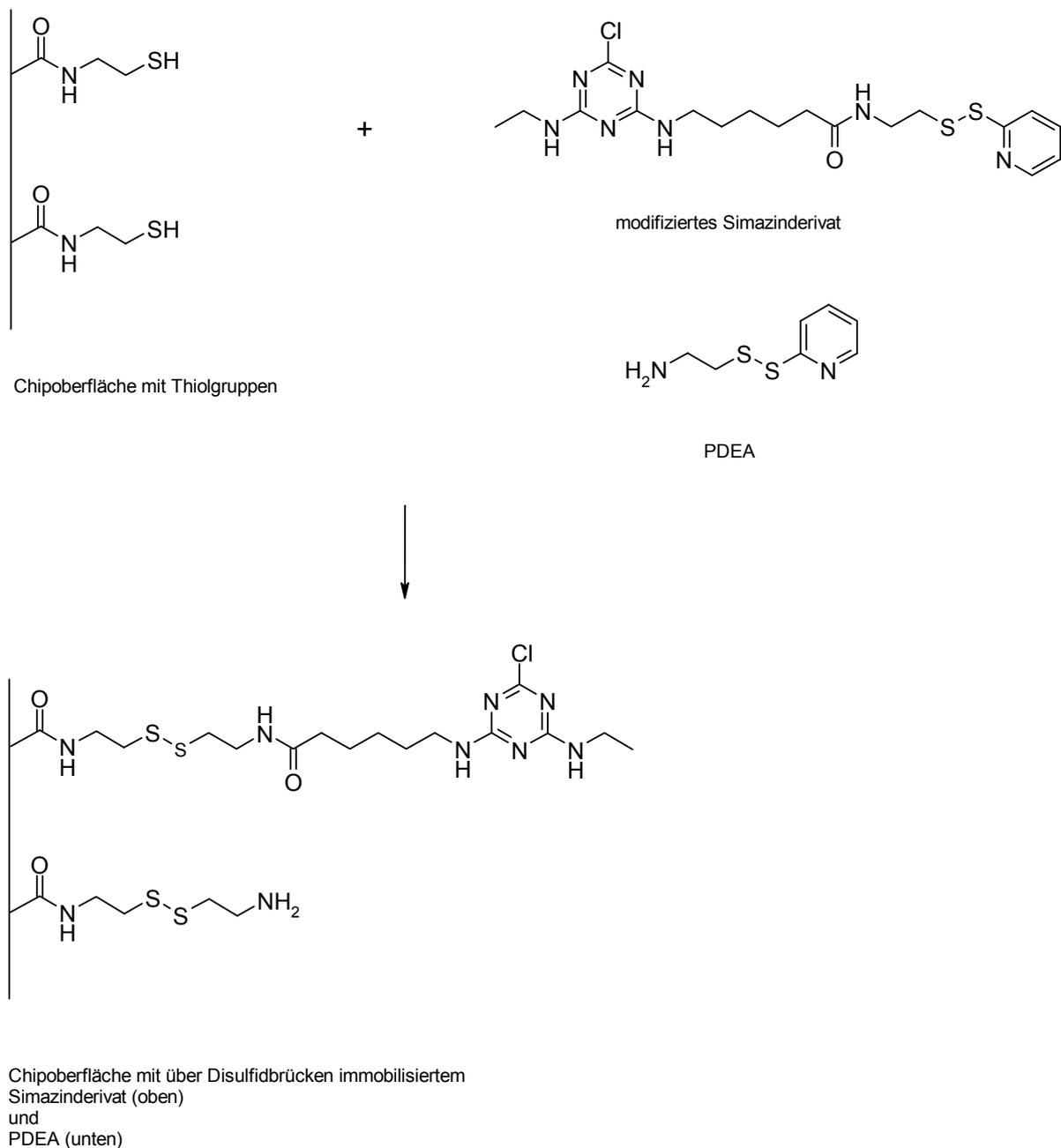


Abb. 2.13 : Immobilisierung des modifizierten Simazinderivates an der modifizierten Chipoberfläche.

2.16.4.1.4 *Abblocken der aktiven Thiolgruppen*

Durch eine 4-minütige Injektion einer Lösung aus 20 mM PDEA (gelöst in Puffer bestehend aus: 0,1 M Na-Acetat, 1 M NaCl, pH 4,0), wurden die Thiolgruppen, die nicht mit der 6-{{4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl}amino}-hexansäure bzw. dem freien PDEA reagiert hatten, abgeblockt.

Alle Messzellen wurden in der oben beschriebenen Weise mit dem Simazinderivat präpariert. Für die Referenz-Flusszelle wurde anstelle des Gemischs aus EDC, NHS, PDEA und der Simazinhexansäure (s. Abschn. 2.16.4.1.1) nur EDC, NHS und PDEA über die Chipoberfläche injiziert.

2.16.4.2 Nachweis der kovalenten Kopplung der Simazinhexansäure über einen Anti-Triazin-Antikörper

Zum Nachweis der erfolgreichen Kopplung der 6-{{4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl}amino}-hexansäure wurde die mit dem Simazinderivat modifizierte Chipoberfläche mit einem polyklonalen Anti-Triazin-AK (BP868, Acris Antibodies, Hiddenhausen, D) darauf überprüft, ob auch die Simazinhexansäure und nicht nur das PDEA an die Oberfläche gekoppelt wurde. Dies war notwendig, da das Simazinderivat mit PDEA, EDC und NHS aktiviert wurde (s. Abschn. 2.16.4.1.1) und es nicht möglich war das PDEA nach der Inkubationszeit aus dem Gemisch zu entfernen; denn die 6-{{4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl}amino}-hexansäure mit ihrem Molekulargewicht von 403 g/mol konnte nicht von dem ähnlich großen PDEA abgetrennt werden. Der Anti-Triazin-AK war nach den Herstellerangaben für den Nachweis von Simazin und Simaziden geeignet.

Zum Nachweis der Kopplung des Simazinderivates wurde der Anti-Triazin-AK in Konzentrationen von 26-867 nM in 0,01 M PBS-Puffer (pH 7,46) gelöst und in 3-minütigen Injektionsintervallen im „Kinject“-Modus mit einer Dissoziationszeit von 2 min über die Chipoberfläche injiziert. Die Regeneration der Chipoberfläche zur Entfernung der gebundenen Antikörper und zur Wiederverwendung im nächsten Messzyklus erfolgte mit einer 100 mM HCl-Lösung. Zur Auswertung wurde automatisch mittels Software (Biacore® 3000 Control Software 4.1., Biacore AB, Uppsala, S) die Referenz-Flusszelle, die gleich behandelt worden war, auf der jedoch kein Simazinderivat immobilisiert war (s. Abschn. 2.16.4.1.4), von der Messflusszelle abgezogen. Zusätzlich wurde ein „double referencing“ durchgeführt, bei dem eine Puffer-Blankinjektion von der Probeninjektion abgezogen wurde. Eine kinetische sowie eine Affinitäts-Auswertung der Messergebnisse wurden mit der BIAevaluation Software Version 4.1 (Biacore AB, Uppsala, S) durchgeführt (s. Abschn. 2.16.2.5).

2.16.4.3 Qualitativer Nachweis der Bindefähigkeit des aufgereinigten D1-Proteins über den Simazinhexansäure-Chip

Zum qualitativen Nachweis der Bindefähigkeit des aufgereinigten D1-Proteins wurden die zur Konzentrierung lyophilisierten (s. Abschn. 2.9) FPLC-Fraktionen (ursprüngliches Volumen 500 µl) in je 85 µl HBS-EP-Puffer (s. Tab. 2.21) aufgenommen, durchmischt und 1 min bei 2.000 g zentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen. Die damit um den Faktor 1:5,88 konzentrierten FPLC-Fraktionen wurden über die mit dem Simazinderivat modifizierte Chipoberfläche (s. Abschn. 2.16.4.1) programmgesteuert im „Kinject“-Modus jeweils 3 min injiziert. Die nachfolgende Dissoziationszeit betrug 2-3 min. Die Messungen wurden bei einer Flussrate von 10 µl/min durchgeführt. Die Proben wurden teilweise im Rack bei 4 °C gekühlt. Vom SPR-Signal der Messflusszelle mit immobilisierten Simazinderivat wurde softwareintern (Biacore® 3000 Control Software, Biacore AB, Uppsala, S) automatisch das Messsignal der Referenz-Flusszelle, die bis auf das Simazinderivat völlig gleich behandelt worden war, abgezogen (s. Abschn. 2.16.4.1.4). Dadurch wurden eventuell vorhandene unspezifische Bindungen des Analyten an die Chipoberfläche herausgerechnet.

Damit nach den Messungen der Einfluss der mobilen FPLC-Phase von den Messkurven abgezogen werden konnte, wurden parallel zu den Probenläufen lyophilisierte und im gleichen Verhältnis konzentrierte reale Blank-FPLC-Läufe von nur mit Butanol ausgeschütteltem Waschpuffer (s. Abschn. 2.3.3 und 2.4) über die Chipoberfläche injiziert. Diese Blank-Fraktionen wurden von den Proben-Fraktionen mit Hilfe der BIAevaluation Software (Biacore AB, Uppsala, S) abgezogen. Mit diesem so genannten „double referencing“ konnten die Messwerte vom Einfluss des Lösungsmittels in den Proben bereinigt werden.

2.16.5 SPR-Nachweis von Herbiziden über einen D1-Protein-Chip/PS-II-Proteinkomplex-Chip

2.16.5.1 Kopplung der D1-Proteine bzw. der PS-II-Proteinkomplexe an einen CM5-Chip über die Aminkopplungsmethode

Für die Kopplung der isolierten D1-Proteine an einen CM5-Chip (Biacore AB, Uppsala, S) wurden die über die FPLC isolierten Fraktionen mit D1-Protein vereinigt, gefriergetrocknet und mit Aq. dest. resuspendiert, wobei sie im Verhältnis 10:1 konzentriert wurden. Im Anschluss wurden sie in einer Konzentration von 62 µg/ml über die Aminkopplung, wie in Abschnitt 2.16.3.1 beschrieben, kovalent an die Chipoberfläche gekoppelt. Als Immobilisierungspuffer wurde 20 mM Citrat (pH 3,0) verwendet.

Parallel zu den D1-Proteinen wurden teilweise auch PS-II-Proteinkomplexe auf eine parallele Flusszelle desselben Chips gekoppelt. Ein PS-II-Proteinkomplex von *Vicia faba*, PS II 53 BL, wurde bei einer Proteinkonzentration von 58 µg/ml mit einem Immobilisierungspuffer aus 20 mM Citrat (pH 3,5) immobilisiert. Ein PS-II-Proteinkomplex von *Pisum sativum*, PS II 55 E1, wurde mit einer Konzentration von 56 µg/ml in 20 mM Citrat-Puffer (pH 3,0), an eine weitere Flusszelle des CM5-Chips gebunden.

2.16.5.2 Messung der Herbizide am D1-Protein-Chip/PS-II-Proteinkomplex-Chip

Für die Bindungsexperimente wurde ein „Small molecules screening assay“ mit einer selbst geschriebenen MDL-Methode (Method-Definition-Language-Methode) (s. Anhang 7.4) durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 0,01 M PBS-Puffer mit 1 % (v/v) Ethanol (EtOH) verwendet, dem teilweise 0,005 % (v/v) Polysorbat 20 (P20) zugesetzt wurde.

Die Herbizide wurden in Konzentrationen von 10-100 µg/ml in 0,01 M PBS mit 1 % (v/v) EtOH und teilweise mit 0,005 % (v/v) P20 in Injektionsintervallen von 1 min im „Kinject“-Modus mit einer 5-minütigen Dissoziationszeit injiziert. Durchgeführt wurden die Versuche bei einer Flussrate von 30 µl/min. Zwischen den Herbizidinjektionen wurde jeweils eine Blankinjektion als Negativ-Kontrolle (negcontrol) mit 0,01 M PBS mit 1 % (v/v) EtOH (teils mit 0,005 % (v/v) P20) zwischengeschaltet, um den Einfluss des Puffers herausfiltern und bei der Auswertung das so genannte „double referencing“ durchführen zu können. Beim „double referencing“ wird die bereits von der Referenz-Flusszelle abgezogene Pufferinjektion von der ebenfalls bereits von der Referenz-Flusszelle abgezogenen Probeninjektion subtrahiert. An den Anfang wurden 5 Startup-Injektionen von ebenfalls 0,01 M PBS mit 1 % (v/v) EtOH (teils mit 0,005 % (v/v) P20) gesetzt, um die Chipoberfläche zu „normalisieren“. Nach jeder Injektion wurden sowohl für die IFC als auch für die Nadel Waschzyklen eingefügt, um eine Probenverschleppung (carry over) zwischen den Proben zu verhindern. Als carry-over-Kontrolle folgte auf jede Probeninjektion eine Injektion von 0,01 M PBS mit 1 % (v/v) EtOH (teils mit 0,005 % (v/v) P20). Zusätzlich wurde eine Kalibrierungsreihe mit acht verschiedenen EtOH-Konzentrationen von 0,5-1,8 % bzw. 0-3 % (v/v) EtOH angesetzt, die jeweils vor und nach den Probeninjektionen für je 30 s injiziert wurden. Mit diesen Lösungsmittel-Korrektionslösungen (solvent-correction-Lösungen) wurde bei der Auswertung in der BIAevaluation Software (Biacore AB, Uppsala, S) (s. Abschn. 2.16.2.5) eine Kalibrierungskurve erstellt, um den Fehler, der durch die Masse des Lösungsmittels verursacht wird, herausrechnen zu können. Dieses war notwendig, da große Unterschiede im Immobilisierungslevel der Referenz-Flusszelle (ohne Ligand) und der spezifischen Messflusszelle (D1-Protein/PS-II-Proteinkomplex) zu erheblichen Differenzen in den

Masseneffekten führen können, wenn die Ligandenmoleküle das EtOH von dem zu detektierenden Volumen ausschließen. Daher kann es selbst bei geringen Variationen in der Zusammensetzung der einzelnen Proben schon zu beträchtlichen Unterschieden zwischen den verschiedenen Flusszellen kommen. Bei der Kalibrierungskurve wurden die Messwerte der Referenz-Flusszelle gegen die Messwerte der Referenz-subtrahierten Messzelle aufgetragen. Über die aufgestellte Kalibrierungskurve konnten dann die Verschiebungen durch den Masseneffekt von den tatsächlich gemessenen Referenz-subtrahierten Messwerten abgezogen werden.

Da Verbindungen mit einem höheren Molekulargewicht auch eine relativ höhere Bindungsantwort liefern, wurden die Messwerte teilweise auch molekulargewichtskorrigiert, um den Effekt durch die unterschiedlichen Molekulargewichte der verschiedenen Herbizide zu eliminieren.

Hierbei war zu beachten, dass die verschiedenen Herbizidlösungen, die Lösungsmittel-Korrektionslösungen, die carry-over-Kontrollen, die Negativ-Kontrollen und die Startup-Injektionen, auf die gleiche Weise und mit dem gleichen Puffer sowie Lösungsmittel hergestellt wurden, um Fehler beim Ansetzen der Lösungen zu vermeiden, die zu erheblichen Schwankungen in den Messwerten hätten führen können.

2.17 Biacore-MS-Kopplung/Analyte recovery mit dem Biacore® 3000

Das in dieser Arbeit verwendete Biacore® 3000 besitzt eine Kopplung der SPR-Technologie mit der Massenspektrometrie (Biacore-MS-Kopplung bzw. Biacore analyte recovery). Es handelt sich dabei um eine Technologie, bei der die Methoden der SPR und der Massenspektrometrie (MS) miteinander verbunden werden. Durch diese Kopplung ist es möglich, den Partner einer Bindungsreaktion zu eluieren und sofort massenspektrometrisch zu identifizieren.

Bei dem Biacore analyte recovery werden über eine Elutionsprozedur die zuvor gebundenen Analyten in einem sehr geringen Volumen von nur 2 µl eluiert („recovery“). Die Elutionsprozedur ist mit einer einheitlichen Serie von Waschschritten verbunden, damit nicht-spezifische Bindungen an die Flusszell-Elemente herabgesetzt werden. Die „Recovery“-Lösung mit dem eluierten Analyt wird dabei zwischen Luftblasen gehalten, so dass das eluierte Material konzentriert bleibt. Im nächsten Schritt kann der zurückgewonnene Analyt direkt auf eine MALDI-Platte (**M**atrix-**a**ssisted-**L**aser-**D**esorption/**I**onization-Platte) abgesetzt und sofort anschließend über Massenspektrometrie analysiert und identifiziert werden (s. Abschn. 2.17.1 und 2.17.2) (Sönksen *et al.*, 1998).

2.17.1 Testsystem Peroxidase ↔ Anti-Peroxidase-Antikörper

Zur späteren Anwendung des analyte recovery zum wirkungsbezogenen Nachweis von PS-II-Herbiziden über die Bindung an ein immobilisiertes D1-Protein und deren nachfolgende Identifizierung mittels Massenspektrometrie wurde ein Testsystem, bestehend aus einem Anti-Peroxidase-Antikörper als Liganden und pflanzlicher Horseradish-Peroxidase (POX) als Analyten, entwickelt. Der monoklonale Anti-Horseradish-Peroxidase-Antikörper (Anti-HRP-AK) (Katalog Nr.: K86414M, Lot Nr.: 8A02604, Klon: 3P/2H11, gegen HRP-Isoformen mit pI's von 3,5 bis 9,5, Biotec, USA, Vertrieb über Dunn Labortechnik, Asbach, D) wurde über die schon in Abschnitt 2.16.3.1 beschriebene Aminkopplungsmethode an einen CM5-Chip immobilisiert. Dazu wurde der Anti-Peroxidase-AK mit einer Konzentration von 60 µg/ml in einem 20 mM Citrat-Puffer (pH 3,2), über ein Immobilisierungs-Programm an die Chipoberfläche gekoppelt.

Als Analyt wurde pflanzliche Horseradish-Peroxidase (Produkt Nr. 77330, Fluka, Buchs, CH) mit einer Konzentration von 400 µg/ml verwendet. Die Horseradish-Peroxidase wurde dazu in HBS-N-Puffer (s. Tab 2.22.) gelöst, da dieser mit dem Messsystem der Massenspektrometrie kompatibel ist.

0,01 M	HEPES pH 7.4
0,15 M	NaCl

Tab. 2.22 : Zusammensetzung des HBS-N-Puffers.

2.17.2 Biacore analyte recovery

Nach einem 50-sekundigen Fluss von HBS-N-Laufpuffer (s. Tab. 2.22) wurde zunächst als MS-kompatibler Puffer 50 mM Ammoniumbicarbonat bzw. HBS-N-Puffer für die Dauer von 1 min injiziert, um eine Basislinie zu schaffen, auf die die Höhe des zurückgewonnenen („recovered“) Analyten bezogen werden konnte. Es folgte die Injektion des Analyten Peroxidase (400 µg/ml) für 10 min. Direkt nach der Probeninjektion wurde die IFC inklusive des Flusszellenbereichs für 6 s mit MS-kompatiblen Puffer, 50 mM Ammoniumbicarbonat bzw. HBS-N-Puffer, gefüllt. Danach wurde der Fluss über die Flusszellen gestoppt. Der Autosampler und die IFC, ohne die Flusszellen, wurden sequentiell mit drei aufeinander folgenden Lösungen gewaschen, um eine Probenverschleppung von der injizierten Probe zur zurückgewonnenen Probe zu vermeiden. Als Waschlösungen wurden, um die IFC vor dem Proben-„Recovery“ zu equilibrieren, in folgender Reihenfolge verwendet: 50 mM Ammoniumbicarbonat bzw. HBS-N-Puffer (Sensorchip-Waschlösung), 50 mM NaOH bzw. HBS-N-Puffer (Flusssystem-Waschlösung 1) und als letzte Lösung 50 mM

Ammoniumbicarbonat bzw. HBS-N-Puffer (Flusssystem-Waschlösung 2). Während dieser Waschprozeduren blieben die Flusszellen mit dem MS-kompatiblen Puffer gefüllt.

Das analyt recovery begann mit dem Waschen der Injektions-Öffnung und den gewählten Flusszellen mit dem MS-kompatiblen Puffer, 50 mM Ammoniumbicarbonat bzw. HBS-N-Puffer. Für die Zurückgewinnung der Probe wurde ein 2 µl Segment von 10 mM HCl („Recovery“-Lösung) auf die gewählten Flusszellen geleitet, dem 30 s lange Luftsegmente vorangingen und folgten. Diese Luftsegmente führten zu einer nicht zu verhindernden Störung des SPR-Signals, die im Sensorgramm als grau hinterlegte Peaks zu sehen war.

Nach einer Inkubationszeit der „Recovery“-Lösung von 30 s wurde das 2 µl Segment mit dem dann zurückgewonnenen Analyten (Peroxidase) zurück in die Autosampler-Nadel gezogen und direkt auf eine mit Sinapinsäure präparierte MALDI-Platte (Bruker 384 well MTP-Ankertarget®, Bruker Daltonics, Bremen, D) (s. Abschn. 2.17.3) getropft (s. Abb. 2.14 und 2.15). Während die Probe abgesetzt wurde, wurde als MS-kompatibler Puffer 50 mM Ammoniumbicarbonat bzw. HBS-N-Puffer über die Flusszellen geleitet, um wieder eine Basislinie zur Bestimmung der Menge an zurückgewonnenen Analyten zu erhalten (Roepstorff *et al.*, 1999; Biacore Technology Note 2, 2002; Biacore Technology Note 6, 2002; Biacore Technology Note 18, 2003).

Das Biacore analyte recovery wurde mit dem Analyte-recovery-Programm mit der Biacore® 3000 Control Software 4.1 (Biacore AB, Uppsala, S) durchgeführt.

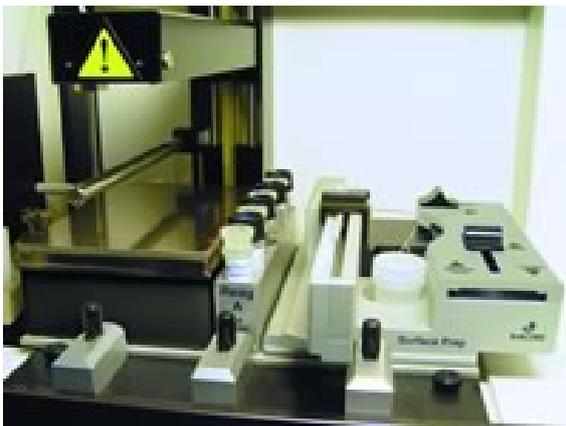


Abb. 2.14 : Autosampler mit MALDI-Platte und Surface Prep unit.

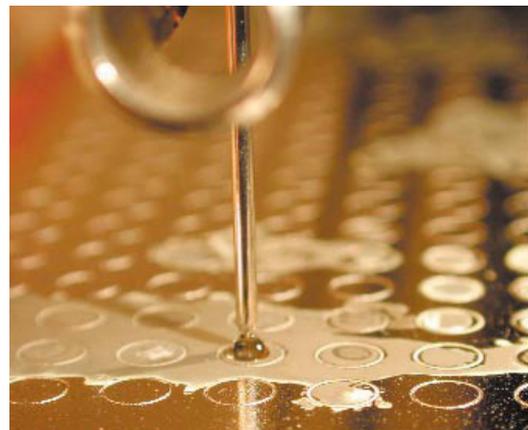


Abb. 2.15 : Autosampler-Nadel beim Absetzen der zurückgewonnenen Lösung auf eine MALDI-Platte.

2.17.3 Massenspektrometrische Messungen der Peroxidase

Die massenspektrometrischen Messungen wurden von Herrn Gerhard Treitz und Herrn Dr. Martin Zabe, der Gruppe Functional Peptides, caesar Forschungszentrum, in Bonn durchgeführt.

Für die massenspektrometrischen Messungen wurde ein Bruker Reflex III (Bruker Daltonics, Bremen, D) MALDI-TOF-Massenspektrometer (Matrix-assisted-Laser-Desorption/Ionization-Time-of-Flight-Massenspektrometer) mit Stickstofflaser (337 nm) eingesetzt. Als MALDI-Platte wurde ein MTP-Ankertarget® mit 400 µm Messplätzen (Spots) (Bruker 384 well MTP-Ankertarget®, Bruker Daltonics, Bremen, D) benutzt.

Als MALDI-Matrix wurde 98%ige (w/v) 3,5-Dimethoxy-4-hydroxycimtsäure (Sinapinsäure = sinapinic acid = SA) verwendet, die wie folgt angesetzt wurde: Als Matrix-Stocklösung wurde eine gesättigte Lösung von SA in 33 % Acetonitril, 66,9 % Wasser und 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) (v/v/v) angesetzt. Dazu wurde eine Spatelspitze SA mit 50 µl Lösemittel (s.o.) versetzt, durchmischt, 5 min mit Ultraschall behandelt und 5 min bei 10.000 g zentrifugiert. Über die Verdünnung des Überstandes der Matrix-Stammlösung (gesättigte Lösung) im Verhältnis 1:5 (v/v) mit einer Lösung, bestehend aus 80 % Acetonitril, 19,9 % Wasser und 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) (v/v/v), wurde eine Matrixlösung für die Präparation des Ankertargets hergestellt. Für diese Präparation wurden 0,2 µl Matrix-Lösung auf einen Spot gegeben und im Anschluss auskristallisieren und trocknen gelassen. Auf diese so vorbereitete MALDI-Platte fand die Elution der Peroxidase (POX) mit 10 mM HCl von dem präparierten Biacore®-Chip (s. Abschn. 2.17.2) statt. Es folgte die Zugabe von 0,5 µl Matrix-Lösung auf diesen Spot, die dann auskristallisieren und trocknen gelassen wurde.

Direkt anschließend an das Biacore analyte recovery wurde die MALDI-Platte in das MALDI-TOF-Massenspektrometer eingesetzt, die Messungen wurden im „Linear“-Modus durchgeführt. Dabei betragen die Beschleunigungsspannung 20 kV, die Linsenspannung 10 kV, die „Delay“-Zeit 50.000 ns und die Laserabschwächung 44 %.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, Herbizid-bindefähiges D1-Protein mit funktionell erhaltener Q_B-Bindenische aus verschiedenen Pflanzenspezies aufzureinigen, das als biologische Einheit in einem SPR-Biosensor zum Nachweis von PS-II-Herbiziden eingesetzt werden sollte. Um die D1-Protein-Aufreinigung zu überwachen, wurden jeweils die verschiedenen Aufreinigungsschritte mit den vier Methoden der SDS-PAGE, des Western-Blottings, der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) mit Anti-D1-AK-Chip und der SPR mit Simazinderivat-Chip charakterisiert. Zusätzlich wurden die PS-II-Proteinkomplexe hinsichtlich ihres Proteingehaltes und der Vitalität der aus ihnen isolierten Thylakoide beurteilt.

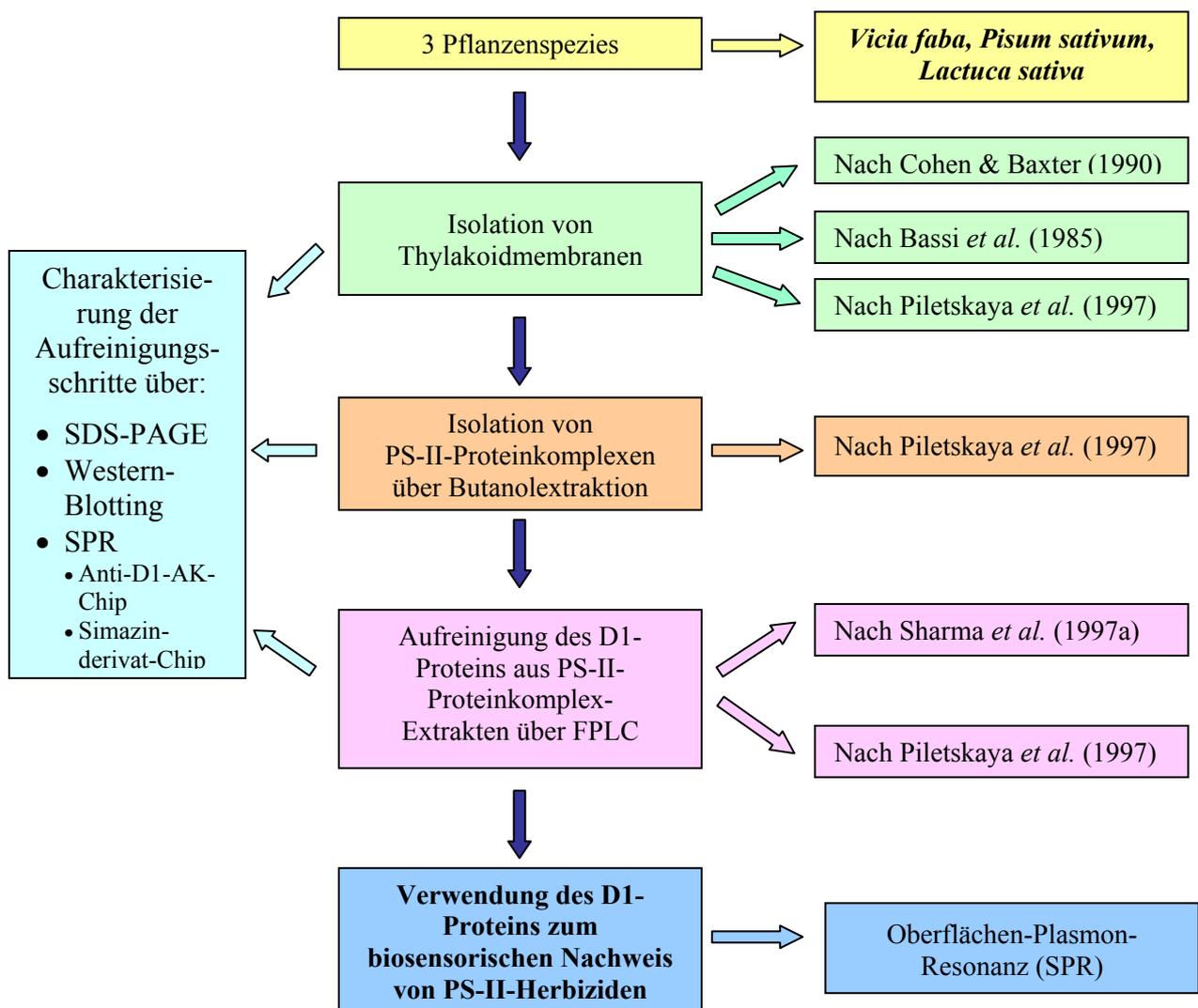


Abb. 3.1: Übersicht der einzelnen Schritte der D1-Protein-Aufreinigung sowie der verwendeten Isolationsmethoden und der zu ihrer Charakterisierung verwendeten Methoden.

Die Abbildung 3.1 gibt einen allgemeinen Überblick über die verschiedenen Schritte der D1-Protein-Aufreinigung, die verwendeten Isolationsmethoden und die Charakterisierung der einzelnen Aufreinigungsschritte über SDS-PAGE, Western-Blotting und Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR), sowie über den Einsatz des D1-Proteins für den biosensorischen Nachweis von PS-II-Herbiziden.

Für die weiteren Erläuterungen ist im Anhang (Abschnitt 7.1) eine Übersicht über die durchgeführten PS-II-Proteinkomplex-Extraktionen aufgeführt.

3.1 Isolation von Thylakoidmembranen

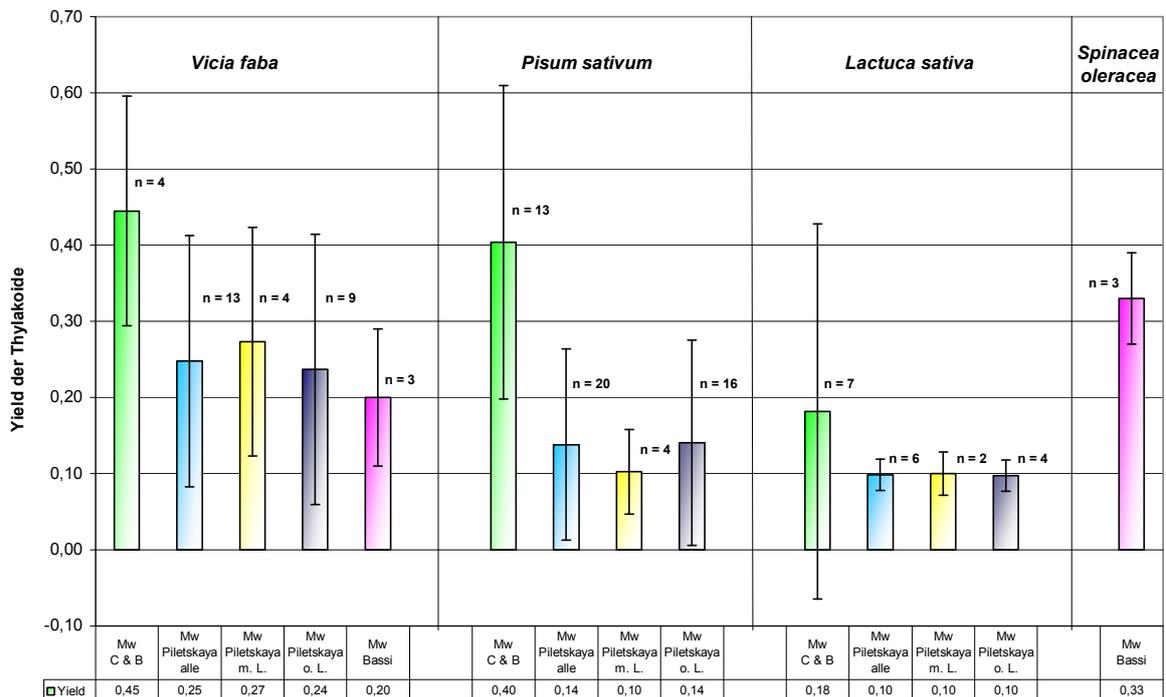
3.1.1 Vitalität der Thylakoide

Als ein Vitalitätskriterium der Isolate wurde der Yield der isolierten Thylakoide während der Aufreinigung des D1-Proteins untersucht. Der Yield wurde, wie in Abschnitt 2.7.1 beschrieben, gemessen und ist ein Maß für die relative Elektronentransportrate (Genty *et al.*, 1989) und damit für die Aktivität und die Funktionalität der photosynthetischen Elektronentransportkette der isolierten Thylakoide. Damit kann dieser Wert einen Aufschluss über den Zustand und die Funktionalität des in den weiteren Schritten zu isolierenden D1-Proteins geben. Ein Yield von mehr als 0,5 zeigte eine intakte und funktionsfähige Elektronentransportkette an. Er lässt jedoch nicht die Schlussfolgerung zu, dass bei Isolaten mit einem sehr geringen Yield das D1-Protein nicht mehr funktionsfähig vorliegt, da der Elektronentransport an jeder Stelle der Elektronentransportkette unterbrochen sein kann und somit kein Elektronenfluss mehr messbar wäre, das D1-Protein in seiner Bindungsfunktion aber noch voll funktionsfähig erhalten sein kann.

Die Abbildung 3.2 zeigt den Vergleich des Yields der Thylakoide, aus denen die PS-II-Proteinkomplexe aufgereinigt wurden, zwischen den verschiedenen Pflanzenspezies: *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Lactuca sativa* und *Spinacea oleracea* sowie den Vergleich der Isolationsmethoden: Cohen & Baxter (1990), Bassi *et al.* (1985) und Piletskaya *et al.* (1997). Innerhalb der Isolationsmethode nach Piletskaya *et al.* (1997) wurden auch die verschiedenen Anzuchtbedingungen der Pflanzen mit und ohne künstliche Zusatzbelichtung miteinander verglichen.

Es zeigten sich zwischen den verschiedenen Thylakoidisolaten einer Spezies und einer Isolationsmethode sehr große Variationen der Yields (s. Abb. 3.2, Standardabweichungen), so dass keine bedeutsamen Unterschiede gefunden wurden, aber tendenzielle Unterschiede erkannt werden konnten.

Vergleich der Mittelwerte der Yields der Thylakoide von *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Lactuca sativa* und *Spinacea oleracea* und der Isolationsmethoden nach Cohen & Baxter (1990), Piletskaya *et al.* (1997) und Bassi *et al.* (1985)



Mittelwerte der versch. Isolationsmethoden und Pflanzenpezies

Abb. 3.2: Vergleich der Mittelwerte (Mw) der Yields der drei Isolationsmethoden nach Cohen & Baxter (1990), Piletskaya *et al.* (1997) und Bassi *et al.* (1985) sowie der vier Pflanzenspezies: *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Lactuca sativa* und *Spinacea oleracea*. Grün = Mittelwert (Mw) der Cohen & Baxter-Isolate (C & B), türkis = Mittelwert (Mw) aller Piletskaya-Isolate, gelb = Mittelwert (Mw) aller Piletskaya-Isolate von Pflanzen die mit künstlicher Zusatzbelichtung angezogen wurden, dunkelblau = Mittelwert (Mw) aller Piletskaya-Isolate von Pflanzen die ohne künstliche Zusatzbelichtung angezogen wurden und pink = Bassi-Isolate. M. L. = Anzucht mit künstlicher Zusatzbelichtung, o. L. = Anzucht ohne künstliche Zusatzbelichtung. Mw = Mittelwert, Fehlerindikator = \pm Standardabweichung, n = Anzahl der Isolate (s. Anhang 7.1 und 7.6).

Im Vergleich der Pflanzenspezies *Vicia faba*, *Pisum sativum* und *Lactuca sativa* zeigten die Thylakoide von *Vicia faba* nicht nur die höchsten Proteingehalte (s. Abschn. 3.1.3) sondern auch die höchsten Yield-Werte und damit die höchste Vitalität, gefolgt von *Pisum sativum* und *Lactuca sativa*. Dieses Ergebnis zeigte sich unabhängig davon, ob die Isolationsmethode nach Cohen & Baxter (1990) oder Piletskaya *et al.* (1997) angewandt wurde.

Beim Vergleich der Isolationsmethoden nach Cohen & Baxter (1990) und Piletskaya *et al.* (1997) war bei den drei Pflanzenspezies *Vicia faba*, *Pisum sativum* und *Lactuca sativa* bei den Cohen & Baxter-Isolaten ein deutlich höherer Yield zu messen und damit eine deutlich höhere Vitalität nachzuweisen.

Bei *Pisum sativum* lag der Yield bei den nach Cohen & Baxter (1990) isolierten Thylakoiden mit 0,4 um 65 % über denen nach Piletskaya *et al.* (1997) (Yield = 0,14) isolierten. Bei *Vicia faba* war diese Tendenz ebenso zu beobachten, jedoch in geringerem Maße. Hier lag der Mittelwert der Yields bei den Cohen & Baxter-Isolaten mit 0,45 um 44 % über den Piletskaya-Isolaten (Yield = 0,25). Bei *Lactuca sativa* war bei den nach Cohen & Baxter

(1990) isolierten Thylakoiden (Yield = 0,18) der Yield um 44 % höher als bei den nach Piletskaya *et al.* (1997) isolierten Thylakoiden (Yield = 0,1). Der Unterschied zwischen den beiden Isolationsmethoden war damit genau so groß wie bei *Vicia faba*.

Bei den nach Bassi *et al.* (1985) aufgereinigten Thylakoiden kann aufgrund der geringen Anzahl an Thylakoidextrakten nur eine Tendenz dargestellt werden. Die nach dieser Methode isolierten Thylakoidextrakte von *Spinacea oleracea* zeigten einen durchschnittlichen Yield von 0,33, die von *Vicia faba* von nur 0,20. Im Vergleich der drei Isolationsmethoden bei der Pflanzenspezies *Vicia faba* wiesen die nach Bassi *et al.* (1985) isolierten Thylakoidextrakte durchschnittlich den geringsten Yield auf (0,20); er lag damit um 56 % unterhalb des Yield-Mittelwertes der nach Cohen & Baxter (1990) isolierten Thylakoide.

Bei der Isolation von Thylakoiden aus *Spinacea oleracea* bildeten sich keine Pellets während der Zentrifugation, die Ausbeute an Thylakoidmembranen war daher im Vergleich zu den anderen Pflanzenspezies sehr gering (Ergebnisse hier nicht dargestellt). Aufgrund der geringen Thylakoidausbeute aus dieser Spezies, die sich unabhängig von der Isolationsmethode zeigte, wurde diese Pflanze aus den Untersuchungen ausgeschlossen. Infolgedessen konnte innerhalb der Pflanzenspezies *Spinacea oleracea* kein Vergleich zwischen den verschiedenen Isolationsmethoden getroffen werden.

In Bezug auf die Anzuchtbedingungen ließen sich keine großen Unterschiede in der Vitalität der Thylakoide erkennen. Bei nach Piletskaya *et al.* (1997) isolierten Thylakoiden von *Vicia faba* lag der Yield bei den mit künstlicher Zusatzbelichtung angezogenen Pflanzen mit 0,27 leicht oberhalb von denen die ohne künstliche Zusatzbelichtung angezogen wurden, die einen Yield von 0,24 aufwiesen. Bei *Pisum sativum* verhielt es sich genau umgekehrt, hier wiesen die Thylakoide aus mit künstlicher Zusatzbelichtung angezogenen Pflanzen mit 0,10 einen geringeren Yield auf als die Thylakoide aus Pflanzen die ohne künstliche Zusatzbelichtung angezogen wurden (Yield = 0,14).

3.1.2 Nachweis von D1-Protein in Thylakoidextrakten über Western-Blotting

Um die Aufreinigung von D1-Protein in der PS-II-Extraktion (s. Abschn. 2.4) zu verfolgen, wurden die Thylakoidextrakte auf das Vorhandensein von D1-Protein untersucht. Dies wurde mit der in Abschnitt 2.14 beschriebenen Western-Blotting-Methode mit spezifischem Anti-D1-Antikörper (Agrisera, Vännäs, S) durchgeführt.

Es wurden die vier Pflanzenspezies *Pisum sativum* (Bahn 1), *Lactuca sativa* (Bahn 2), *Vicia faba* (Bahn 3) und *Spinacea oleracea* (Bahn 4) getestet (s. Abb. 3.3), um die für die weitere

Aufreinigung von D1-Protein am besten geeignete Spezies zu finden. Es wurden nur Isolate der Thylakoidextraktionsmethode von Cohen & Baxter (1990) untersucht.

In Abbildung 3.3 ist der Western-Blot mit spezifischem Anti-D1-Antikörper zum Nachweis von D1-Protein in nach Cohen & Baxter (1990) aufgereinigten Thylakoidextrakten verschiedener Pflanzenspezies dargestellt. Der stärkste Nachweis des D1-Proteins zeigte sich bei *Lactuca sativa* (Bahn 2) auf der Höhe der 32,5-kDa- sowie der 62,5-kDa-Marker-Bande. Bei *Pisum sativum* (Bahn 1) war auf Höhe der 32,5- und 62,5-kDa-Marker-Bande ebenfalls D1-Protein, jedoch in geringerem Maße, nachzuweisen. Bei *Spinacea oleracea* (Bahn 4) konnte nur noch ein geringer Nachweis von D1-Protein auf der Höhe der 32,5-kDa-Marker-Bande beobachtet werden. Ein Nachweis von D1-Protein über den spezifischen Anti-D1-Antikörper war in dem Thylakoidextrakt von *Vicia faba* (Bahn 3) nur ganz schwach möglich.

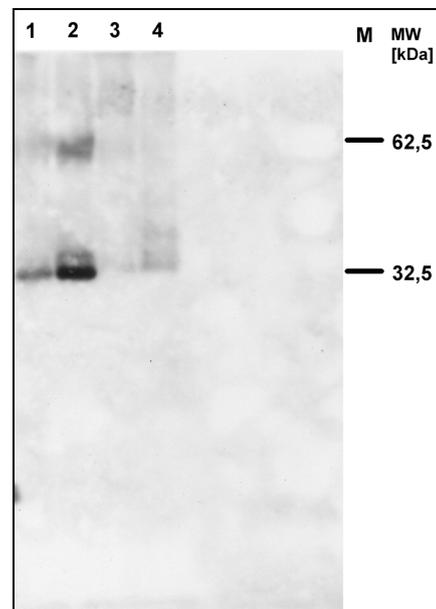


Abb. 3.3: Western-Blot mit spezifischen Anti-D1-Antikörper (Agrisera, Vännäs, S) zum Nachweis von D1-Protein in Thylakoidextrakten verschiedener Pflanzenspezies:

- 1 = Thylakoidextrakt von *Pisum sativum*
- 2 = Thylakoidextrakt von *Lactuca sativa*
- 3 = Thylakoidextrakt von *Vicia faba*
- 4 = Thylakoidextrakt von *Spinacea oleracea*

Rechts Marker nachgezeichnet, M = Marker, MW = Molekulargewicht (kDa).

3.1.3 Proteingehalte der PS-II-Proteinkomplexe

Die Bestimmung der Proteingehalte der PS-II-Proteinkomplexe wurde als ein weiteres Kriterium ausgewählt, um zu überprüfen, welche Thylakoidisolationmethode und welche Pflanzenspezies am besten für die weitere Aufreinigung des D1-Proteins aus den PS-II-Proteinkomplexen geeignet ist, um eine möglichst große Ausbeute an D1-Protein zu erzielen. Es kam zu sehr hohen Variationen der Proteingehalte der verschiedenen PS-II-Proteinkomplex-Extrakte innerhalb einer Spezies und innerhalb einer Isolationsmethode (s. Abb. 3.4). Nur der Mittelwert der Proteingehalte der PS-II-Proteinkomplex-Extrakte von *Vicia faba*, die aus nach der Methode von Cohen & Baxter (1990) aufgereinigten Thylakoiden hergestellt worden waren, unterschied sich bis auf eine Ausnahme signifikant von allen anderen Pflanzenspezies und Isolationsmethoden. Diese Ausnahme bildete der Mittelwert der Proteingehalte der PS-II-Proteinkomplexe von *Pisum sativum*, die aus nach der Methode von

Cohen & Baxter (1990) aufgereinigten Thylakoiden isoliert worden waren. Im Vergleich der übrigen Mittelwerte der Proteingehalte der PS-II-Proteinkomplexe konnten nur tendenzielle Unterschiede gefunden werden.

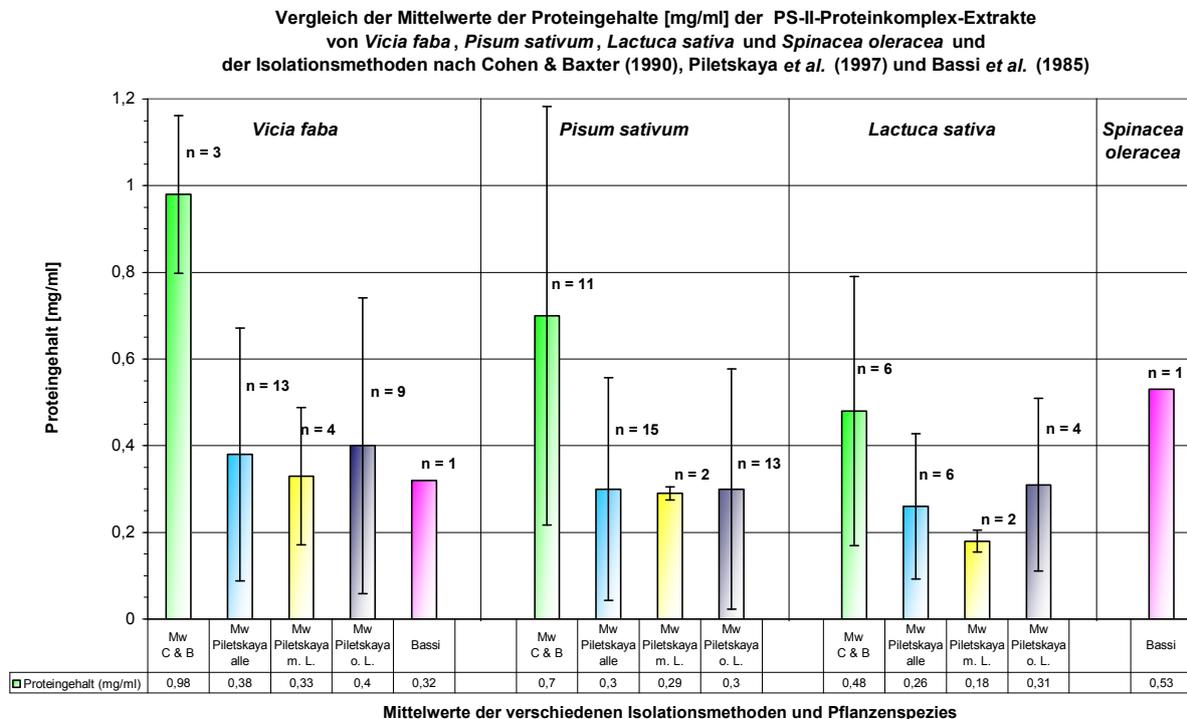


Abb. 3.4: Vergleich der Mittelwerte (Mw) der Proteingehalte (mg/ml) der PS-II-Proteinkomplex-Extrakte der drei Isolationsmethoden Cohen & Baxter (1990), Piletskaya *et al.* (1997) und Bassi *et al.* (1985) sowie der vier Pflanzenspezies: *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Lactuca sativa* und *Spinacea oleracea*. Grün = Mittelwert (Mw) der Cohen & Baxter-Isolate (C & B), türkis = Mittelwert (Mw) aller Piletskaya-Isolate, gelb = Mittelwert (Mw) aller Piletskaya-Isolate von Pflanzen die mit künstlicher Zusatzbelichtung angezogen wurden, dunkelblau = Mittelwert (Mw) aller Piletskaya-Isolate von Pflanzen die ohne künstliche Zusatzbelichtung angezogen wurden und pink = Bassi-Isolate. M. L. = Anzucht mit künstlicher Zusatzbelichtung, o. L. = Anzucht ohne künstliche Zusatzbelichtung. Mw = Mittelwert, Fehlerindikator = \pm Standardabweichung, n = Anzahl der Extrakte (s. Anhang 7.1).

Vergleich der Thylakoidisolationsmethoden:

Bei einem Vergleich der Thylakoidisolationsmethoden von Cohen & Baxter (1990) und Piletskaya *et al.* (1997) in Bezug auf den Proteingehalt der aufgereinigten PS-II-Proteinkomplex-Extrakte (s. Abb. 3.4) zeigten sich bei jeder der drei Pflanzenspezies *Vicia faba*, *Pisum sativum* und *Lactuca sativa* deutlich höhere Proteingehalte bei den Isolat nach Cohen & Baxter (1990). Die Proteingehalte der nach Cohen & Baxter (1990) aufgereinigten PS-II-Proteinkomplexe von *Vicia faba* lagen mit durchschnittlich 0,98 mg/ml 61 % über den Piletskaya-Isolaten. Die PS-II-Proteinkomplexe von *Pisum sativum* zeigten mit durchschnittlich 0,7 mg/ml Proteingehalt bei den Cohen & Baxter-Extraktionen einen um 57 % höheren Proteingehalt als der Mittelwert der Piletskaya-Isolate (Proteingehalt = 0,3 mg/ml). Bei *Lactuca sativa* ließ sich ein ähnlicher Unterschied zwischen den beiden Isolationsmethoden feststellen. Hier lag der Proteingehalt der nach Cohen & Baxter (1990)

aufgereinigten PS-II-Proteinkomplex-Extrakte durchschnittlich 45 % oberhalb der mit der Piletskaya-Methode isolierten PS-II-Proteinkomplex-Extrakte.

Dieser deutlich erhöhte Proteingehalt bei den PS-II-Proteinkomplexen, die aus Thylakoiden extrahiert wurden, die nach der Cohen & Baxter-Methode isoliert worden waren, lässt sich jedoch zu einem großen Teil auf das in der Isolation als Proteaseinhibitor verwendete BSA zurückführen. Daher ist bei diesen Extrakten nicht zu unterscheiden, wie viel des Proteingehaltes auf die Photosystem-II-Proteine zurückzuführen ist und wie viel auf das zugegebene BSA.

Bei den nach der Thylakoidisolationmethode von Bassi *et al.* (1985) aufgereinigten PS-II-Proteinkomplex-Extrakten kann aufgrund der geringen Anzahl nur eine Tendenz dargestellt werden. Der PS-II-Proteinkomplex von *Spinacea oleracea*, der aus Thylakoiden extrahiert wurde, die nach dieser Methode isoliert worden waren, zeigte einen Proteingehalt von 0,53 mg/ml, der von *Vicia faba* einen von 0,32 mg/ml.

Im Vergleich der drei Isolationsmethoden bei der Pflanzenspezies *Vicia faba* wies der PS-II-Proteinkomplex-Extrakt der aus nach Bassi *et al.* (1985) isolierten Thylakoiden extrahiert wurde den geringsten Proteingehalt auf (0,32 mg/ml). Er lag damit um 67 % unterhalb des Proteingehalt-Mittelwertes der nach Cohen & Baxter (1990) isolierten PS-II-Proteinkomplex-Extrakte.

Da die Spezies *Spinacea oleracea* aufgrund der geringen Thylakoidmembranausbeute und der mangelhaften Isolation schon auf der Stufe der Thylakoidmembranisolation aus den Untersuchungen ausgeschlossen wurde (s. Abschn. 3.1.1), liegt hier nur das Ergebnis für einen PS-II-Proteinkomplex-Extrakt vor.

Vergleich der Pflanzenspezies:

Bei dem Vergleich der Pflanzenspezies bezüglich der Isolationsmethoden nach Cohen & Baxter (1990) und Piletskaya *et al.* (1997) zeigte auch hier *Vicia faba* bei beiden Isolationsmethoden die höchsten Proteingehalte (s. Abb. 3.4), gefolgt von *Pisum sativum* und *Lactuca sativa*. Dabei war der Unterschied in den Proteingehalten zwischen den drei Pflanzenspezies bei den Isolationen nach Cohen & Baxter (1990) größer.

Bei den nach Cohen & Baxter (1990) extrahierten PS-II-Proteinkomplex-Extrakten zeigten sich die höchsten Proteingehalte bei *Vicia faba* mit einem durchschnittlichen Wert von 0,98 mg/ml. Die PS-II-Extrakte von *Lactuca sativa* wiesen mit einem Mittelwert von 0,48 mg/ml den geringsten Proteingehalt der drei Pflanzenspezies auf, wobei die Werte zwischen 0,27 mg/ml und 1,08 mg/ml Proteingehalt schwankten (s. Anhang 7.1). Die Proteingehalte der

Extrakte von *Pisum sativum* lagen mit einem durchschnittlichen Wert von 0,7 mg/ml zwischen denen von *Vicia faba* und *Lactuca sativa*.

Auch bei den aus Thylakoiden nach der Piletskaya-Methode aufgereinigten PS-II-Proteinkomplexen zeigten sich die höchsten Proteingehalte bei der Pflanzenspezies *Vicia faba*. Mit einem durchschnittlichen Proteingehalt von 0,38 mg/ml aller aus *Vicia faba* hergestellten PS-II-Proteinkomplex-Extrakte konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den PS-II-Proteinkomplex-Extrakten aus *Vicia faba* Pflanzen, die ohne oder mit künstlicher Zusatzbelichtung angezogen wurden, festgestellt werden. Die PS-II-Extrakte von Pflanzen, die mit künstlicher Zusatzbelichtung angezogen wurden, wiesen mit einem durchschnittlichen Proteingehalt von 0,33 mg/ml im Vergleich zu denen, die ohne künstliche Zusatzbelichtung angezogen wurden (0,4 mg/ml), einen deutlich geringeren Proteingehalt auf. Die gleiche Beobachtung konnte bei *Lactuca sativa* gemacht werden. Auch hier lag bei den Extrakten, die aus Pflanzen mit künstlicher Zusatzbelichtung aufgereinigt worden waren, der Proteingehalt mit 0,18 mg/ml 42 % unter dem der ohne künstliche Zusatzbelichtung angezogenen (0,31 mg/ml). Insgesamt wiesen die PS-II-Extrakte aus *Lactuca sativa* mit einem durchschnittlichen Proteingehalt von 0,26 mg/ml wie bei den Cohen & Baxter-Isolaten den geringsten Proteingehalt auf. Die PS-II-Proteinkomplexe von *Pisum sativum* lagen mit einem durchschnittlichen Proteingehalt von 0,3 mg/ml zwischen denen von *Vicia faba* und *Lactuca sativa*. Hier konnten keine Unterschiede zwischen Extrakten von Pflanzen, die mit oder ohne künstliche Zusatzbelichtung angezogen worden waren, festgestellt werden.

3.1.4 Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse in Hinblick auf die weiteren Aufreinigungsschritte des D1-Proteins

Nach diesen Ergebnissen wurden sowohl die Thylakoidisolationmethode nach Cohen & Baxter (1990) als auch die nach Piletskaya *et al.* (1997) weiter verfolgt, da die Proteingehalte (s. Abschn. 3.1.3) noch keine Auswahl eines der beiden Verfahren zuließen. Aufgrund der Vitalitätsmessung der Thylakoide (s. Abschn. 3.1.1) erschien zu diesem Zeitpunkt die Thylakoidisolationmethode nach Cohen & Baxter (1990) als besser geeignet.

Da die Ausbeute an Thylakoidmembranen bei der Methode nach Bassi *et al.* (1985) im Vergleich der Methoden sehr gering war und es auf eine hohe Thylakoidausbeute ankam, damit eine genügend große Menge an D1-Protein daraus isoliert werden konnte, wurde diese Methode nicht weiter verfolgt. Zusätzlich zeigte sich diese Methode im Handling sehr schwierig, da sich die Pellets nicht immer vollständig resuspendieren ließen, wodurch ein Großteil an aufgereinigten Membranen verloren ging.

Im Western-Blot der Thylakoidextrakte ließen sich *Lactuca sativa* und *Pisum sativum* als die beiden Pflanzenspezies mit dem besten Nachweis an D1-Protein identifizieren, am Ende der Skala rangierte *Vicia faba* (s. Abschn. 3.1.2). Von allen vier untersuchten Pflanzenspezies zeigte *Vicia faba* jedoch im Durchschnitt die höchste Vitalität der Thylakoide und auch den höchsten Proteingehalt der PS-II-Proteinkomplexe (s. Abschn. 3.1.1 und 3.1.3). Daher wurden die drei Pflanzenspezies *Vicia faba*, *Pisum sativum* und *Lactuca sativa* weiterhin parallel mit dem Ziel untersucht, die Pflanzenspezies mit der besten Eignung für die Isolation eines Herbizid-bindefähigen D1-Proteins zu finden.

Spinacea oleracea wurde zu diesem Zeitpunkt aus den Experimenten ausgeschlossen, da sich hier sowohl die Durchführung der Isolation als ungenügend als auch die Ausbeute an isolierten Thylakoidmembranen als zu gering zeigten (s. Abschn. 3.1.1) und im Western-Blot nur ein sehr schwacher Nachweis von D1-Protein erbracht werden konnte (s. Abschn. 3.1.2).

3.2 Extraktion von PS-II-Proteinkomplexen

Im Anschluss wurden aus den isolierten Thylakoidmembranen die PS-II-Proteinkomplexe nach Piletskaya *et al.* (1997) (s. Abschn. 2.4) extrahiert, um aus diesen später das D1-Protein aufzureinigen zu können.

In dieser zweiten Stufe des D1-Aufreinigungsprozesses wurden die PS-II-Proteinkomplexe auf das Vorhandensein von D1-Protein untersucht. Der Nachweis erfolgte zunächst über die in Abschnitt 2.13 beschriebene SDS-PAGE. Im Weiteren wurde ein spezifischer Nachweis mit einem Anti-D1-Antikörper über das in Abschnitt 2.14 beschriebene Western-Blotting-Verfahren durchgeführt.

Hier wurden die drei Pflanzenspezies *Vicia faba*, *Lactuca sativa* und *Pisum sativum* im Vergleich betrachtet, letztere mit den zwei Varietäten *Feltham first* und *Maiperle*, um die am besten geeignete Pflanzenspezies für die Aufreinigung des D1-Proteins zu finden.

Zusätzlich wurden die beiden Thylakoidaufreinigungsmethoden nach Cohen & Baxter (1990) sowie nach Piletskaya *et al.* (1997) miteinander verglichen, um die am besten geeignete Methode zu ermitteln.

3.2.1 Nachweis von D1-Protein in PS-II-Proteinkomplexen aus nach Piletskaya *et al.* (1997) hergestellten Thylakoiden

3.2.1.1 Vergleich der PS-II-Proteinkomplexe über SDS-PAGE

Zum Vergleich der drei Pflanzenspezies *Vicia faba*, *Lactuca sativa* und *Pisum sativum* (mit den Varietäten *Feltham first* und *Maiperle*) wurden alle vorhandenen PS-II-Proteinkomplexe aus den nach Piletskaya *et al.* (1997) hergestellten Thylakoiden über SDS-PAGE untersucht, um Unterschiede im Proteinmuster und besonders in der Menge an D1-Protein zu ermitteln. Zusätzlich wurde die Anzucht der Pflanzen mit oder ohne künstliche Zusatzbelichtung miteinander verglichen. Damit sollten die für die weiteren Schritte der D1-Protein-Aufreinigung am besten geeignete Pflanzenspezies und die optimale Anzuchtmethode herausgefunden werden.

Bei allen untersuchten PS-II-Proteinkomplex-Extrakten konnte reproduzierbar ein ähnliches Proteinbandenmuster im SDS-PAGE gezeigt werden, exemplarisch in Abbildung 3.5 dargestellt (s. auch Anhang 7.5).

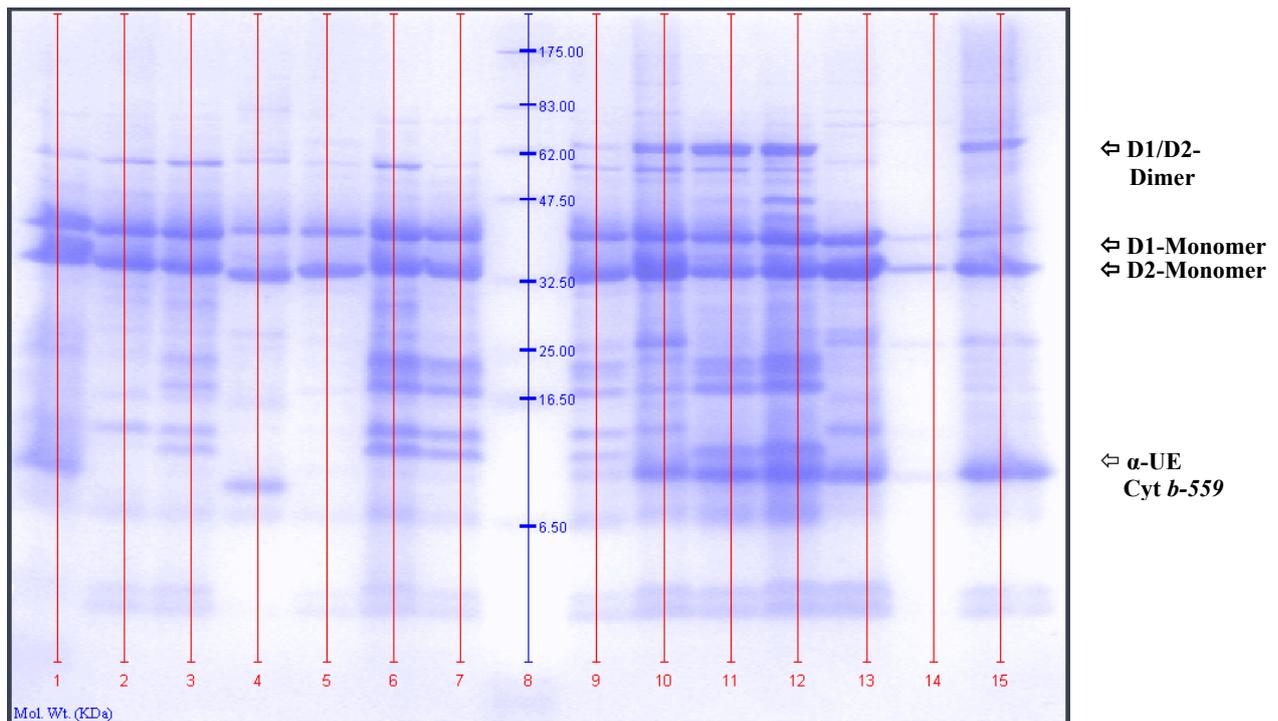


Abb. 3.5: SDS-PAGE von PS-II-Proteinkomplex-Extrakten, die nach der Thylakoidisolationmethode von Piletskaya *et al.* (1997) isoliert wurden. Färbung Coomassie®, Beschriftung: Molekulargewicht der detektierten Banden in kDa, rote Striche und Zahlen: Markierung und Nummerierung der Bahnen.

PS-II-Proteinkomplex-Extrakte von:

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8
Extrakt	PS II 31 E2L	PS II 32 E1	PS II 33 E1L	PS II 34 K	PS II 35 BL	PS II 36E1L	PS II 36 E1	Marker (kDa)
Bahn	9	10	11	12	13	14	15	
Extrakt	PS II 37 BL	PS II 37 B	PS II 39 BL	PS II 39 B	PS II 43 E1	PS II 45 E1L	PS II 48 B	

PS II = PS-II-Proteinkomplex-Extrakt, Zahl = Nummer des Extraktes, B = *Vicia faba*, E1 = *Pisum sativum* var. *Feltham first*, E2 = *Pisum sativum* var. *Maiperle*, K = *Lactuca sativa*. L = Anzucht mit künstlicher Zusatzbelichtung, ohne L = Anzucht ohne künstliche Zusatzbelichtung (s. Anhang 7.1).

Als Gemeinsamkeit war bei allen 32 aufgetrennten PS-II-Proteinkomplex-Extrakten (in Abb. 3.5 auszugsweise dargestellt; Anhang 7.5) eine Doppelbande bei ca. 33 und 39 kDa zu detektieren. Bei der Bande bei ca. 39 kDa handelt es sich nach Nixon *et al.* (1986) und Barber *et al.* (1987) um das gesuchte D1-Protein, bei der Bande bei ca. 33 kDa um das D2-Protein (Nixon *et al.*, 1986; Barber *et al.*, 1987; Nanba und Satoh, 1987; Vacha *et al.*, 1995; Nakazato *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 1997a und 1997b; Kuhl *et al.*, 2000; Komenda *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2004; Mizusawa *et al.*, 2004). Beide Banden waren je nach Extrakt etwas unterschiedlich stark vertreten.

Eine Besonderheit unter den PS-II-Proteinkomplexen stellten die PS-II-Extrakte von *Vicia faba* dar. Nur bei *Vicia faba* zeigten sich Proteinbanden bei ca. 63 kDa, also in dem Bereich, in dem nach Vacha *et al.* (1995), Nakajima *et al.* (1995) und Sharma *et al.* (1997a und 1997b) D1/D2-Dimere zu finden sind. Gleichzeitig konnten bei *Vicia faba* Unterschiede zwischen den beiden getesteten Anzuchtmethoden gefunden werden. Beim Vergleich der beiden parallel zueinander isolierten PS-II-Extrakte PS II 37 BL (s. Abb. 3.5, Bahn 9) und 37 B (s. Abb. 3.5, Bahn 10) zeigte sich die D1/D2-Dimer-Bande beim PS-II-Extrakt 37 B, hergestellt

aus ohne künstliche Zusatzbelichtung angezogenen Pflanzen, deutlich stärker als bei dem Extrakt 37 BL, der aus mit künstlicher Zusatzbelichtung angezogenen Pflanzen gewonnenen wurde. Insgesamt wiesen alle PS-II-Extrakte von *Vicia faba*, die ohne künstliche Zusatzbelichtung angezogen worden waren (PS II 37B, 39B, 48 B, 41 B, 41 B, 51 B, 52 B), deutliche Proteinbanden auf der Höhe der D1/D2-Dimere bei ca. 63 kDa auf (s. Abb. 3.5 und Anhang Abb. 7.1 und 7.2).

Bei keinem der PS-II-Proteinkomplex-Extrakte von *Pisum sativum* oder *Lactuca sativa* konnten Proteine in dem Molekulargewichtsbereich von ca. 63 kDa und damit D1/D2-Dimere gefunden werden. Ebenso wenig wurden bei diesen beiden Pflanzenspezies charakteristische Unterschiede bezüglich der Anzuchtmethode nachgewiesen.

Bei fast allen PS-II-Proteinkomplex-Extrakten zeigte sich noch eine mehr oder weniger deutliche Bande bei ca. 9 kDa; dabei handelt es sich laut Literatur wahrscheinlich um die α -Untereinheit des Cytochroms *b-559* (Nixon *et al.*, 1986; Barber *et al.*, 1987; Nanba und Satoh, 1987; Vacha *et al.*, 1995; Nakazato *et al.*, 1996; Kuhl *et al.*, 2000; Komenda *et al.*, 2002; Mizusawa *et al.*, 2004). Die teilweise vorhandenen und sehr verwaschenen Banden im Molekulargewichtsbereich zwischen ca. 39 kDa und 70 kDa könnten nach der Literatur den Chlorophyll bindenden Proteinen CP43 und CP47 zugeordnet werden (Nakazato *et al.*, 1996; Kuhl *et al.*, 2000; Komenda *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2004; Mizusawa *et al.*, 2004). Die bei einigen PS-II-Proteinkomplexen vorkommende Bande bei ca. 4,5 kDa kann eventuell der β -Untereinheit des Cytochroms *b-559* zugeordnet werden. Nanba und Satoh (1987), Vacha *et al.* (1995) und Komenda *et al.* (2002) haben in diesem Bereich gefundene Banden als β -Untereinheit des Cytochroms *b-559* identifiziert. Weitere schwächere Proteinbanden zeigten sich im Bereich von ca. 100 bis 56 kDa und von ca. 20 bis 4 kDa bei den hier getesteten PS-II-Proteinkomplex-Extrakten aller Pflanzenspezies.

Zwischen den beiden untersuchten Varietäten von *Pisum sativum* zeigten sich keine reproduzierbaren Unterschiede in der Proteinzusammensetzung der PS-II-Proteinkomplexe.

Bezüglich der Menge an isoliertem D1-Protein nahmen auch hier die PS-II-Proteinkomplex-Extrakte von *Vicia faba* eine Sonderstellung ein, da sie wegen des Vorhandenseins von Dimeren insgesamt einen höheren Gehalt an D1-Protein aufwiesen als die anderen beiden Pflanzenspezies, bei denen nur D1-Monomere zu finden waren. Zwischen den verschiedenen Pflanzenspezies ließen sich ansonsten keine markanten Unterschiede bezüglich der Menge an isolierten D1-Protein-Monomeren feststellen. Alle PS-II-Proteinkomplex-Extrakte zeigten reproduzierbar sehr ähnliche Proteinmengen an D1-Monomeren, ohne Unterschiede in Bezug auf die Pflanzenspezies oder Varietät erkennen zu lassen.

3.2.1.2 Exemplarischer Vergleich von ausgewählten PS-II-Proteinkomplex-Extrakten über SDS-PAGE und Western-Blotting

Parallel über SDS-PAGE und Western-Blotting wurden exemplarisch PS-II-Proteinkomplex-Extrakte der Pflanzenspezies *Pisum sativum* var. *Feltham first* und var. *Maiperle*, *Lactuca sativa* und *Vicia faba*, aus mit und ohne künstliche Zusatzbelichtung angezogenen Pflanzen, auf das Vorhandensein von D1-Protein untersucht (s. Abb. 3.6 und 3.7). Über den spezifischen Nachweis des Western-Blottings sollte die über die Literatur ermittelte Lage des D1-Proteins verifiziert und damit genau bestimmt werden, welche Bande der gefundenen Doppelbande (s. Abschn. 3.2.1.1) auf der Höhe von 32-39 kDa dem D1-Protein zuzuordnen ist.

Bei allen hier aufgetrennten PS-II-Proteinkomplex-Extrakten konnte im SDS-PAGE reproduzierbar eine sehr deutliche Doppelbande bei ca. 36 und 32 kDa gefunden werden (s. Abb. 3.6). Diese war bei allen getesteten Extrakten etwa gleich stark, ausgenommen die obere Bande des PS-II-Proteinkomplex-Extraktes 42 K von *Lactuca sativa* (Bahn 6), die etwas schwächer ausgeprägt war.

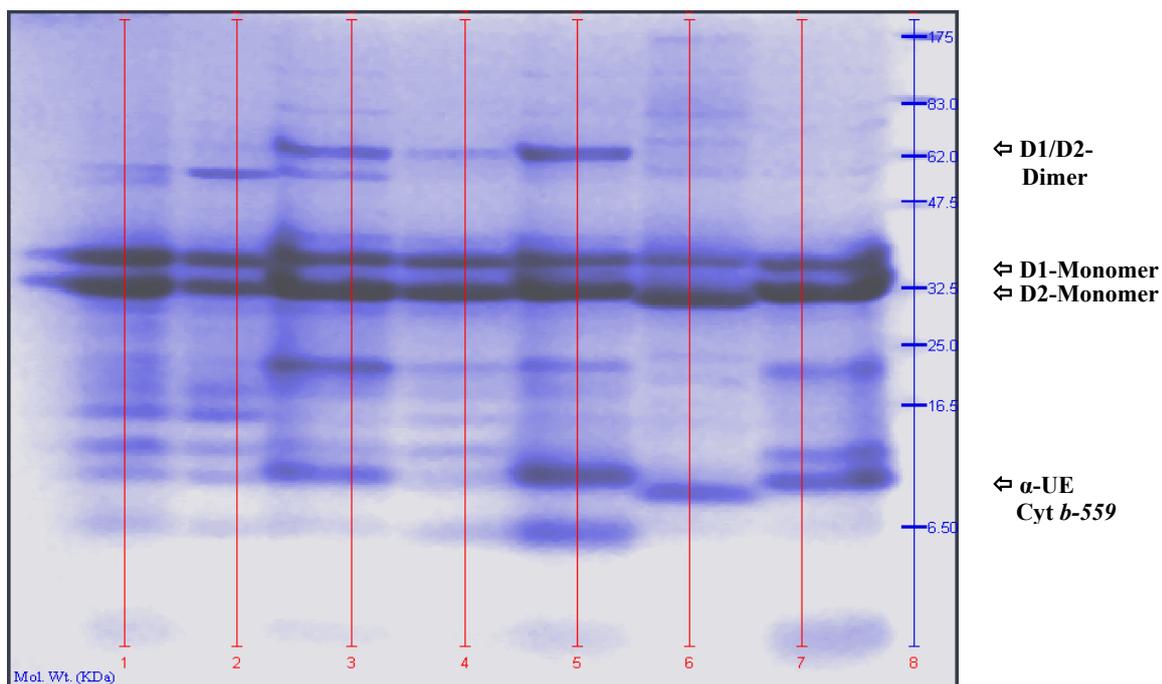


Abb. 3.6: SDS-PAGE von PS-II-Proteinkomplex-Extrakten, die nach der Thylakoidisolationmethode von Piletskaya *et al.* (1997) isoliert wurden. Färbung Coomassie®, Beschriftung: Molekulargewicht der detektierten Banden in kDa, rote Striche und Zahlen: Markierung und Nummerierung der Bahnen.

PS-II-Proteinkomplex-Extrakte von:

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8
Extrakt	33 E1L = <i>Pisum sativum</i> var. <i>Feltham first</i>	33 E2L = <i>Pisum sativum</i> var. <i>Maiperle</i>	37 B = <i>Vicia faba</i> ohne künstliche Zusatzbelichtung	37 BL = <i>Vicia faba</i> mit künstlicher Zusatzbelichtung	41 B = <i>Vicia faba</i> ohne künstliche Zusatzbelichtung	42 K = <i>Lactuca sativa</i>	43 E1 = <i>Pisum sativum</i> var. <i>Feltham first</i>	Marker (kDa)

PS II = PS-II-Proteinkomplex-Extrakt, Zahl = Nummer des Extraktes, B = *Vicia faba*, E1 = *Pisum sativum* var. *Feltham first*, E2 = *Pisum sativum* var. *Maiperle*, K = *Lactuca sativa*. L = Anzucht mit künstlicher Zusatzbelichtung, ohne L = Anzucht ohne künstliche Zusatzbelichtung (s. Anhang 7.1).

Über den Western-Blot mit dem spezifischen Anti-D1-Antikörper konnte die obere der Doppelbande aus dem SDS-PAGE, die oberhalb der 32,5-kDa-Marker-Bande bei ca. 36 kDa lag, bei allen getesteten PS-II-Proteinkomplex-Extrakten der drei verschiedenen Pflanzenspezies, wie schon aus der Literatur erschlossen (s. Abschn. 3.2.1.1), als D1-Protein identifiziert werden (s. Abb. 3.6 und 3.7).

Die nur bei den PS-II-Proteinkomplex-Extrakten von *Vicia faba* (PS II 37 B, Bahn 3 und PS II 41 B, Bahn 5) auftretenden Proteinbanden im Bereich von ca. 62 kDa konnten über den Anti-D1-Antikörper-Nachweis spezifisch als D1/D2-Dimere identifiziert werden. Auch im Western-Blot zeigte sich der, schon über die SDS-PAGE gefundene, deutlich stärkere Anteil des D1/D2-Dimers bei den PS-II-Proteinkomplex-Extrakten von *Vicia faba*-Pflanzen, die ohne künstliche Zusatzbelichtung angezogen wurden (PS II 37 B und 41 B). Bei dem parallel isolierten PS-II-Proteinkomplex-Extrakt von *Vicia faba*, der aus mit künstlicher Zusatzbelichtung angezogenen Pflanzen isoliert worden war (PS II 37 BL), war der spezifische Nachweis des D1/D2-Dimers deutlich geringer, wie auch über die SDS-PAGE beobachtet (s. Abb. 3.6 und 3.7). Bei den PS-II-Proteinkomplex-Extrakten der anderen Pflanzenspezies konnte im Molekulargewichtsbereich von ca. 62 kDa weder über die SDS-PAGE noch über das Western-Blotting D1-Protein detektiert werden.

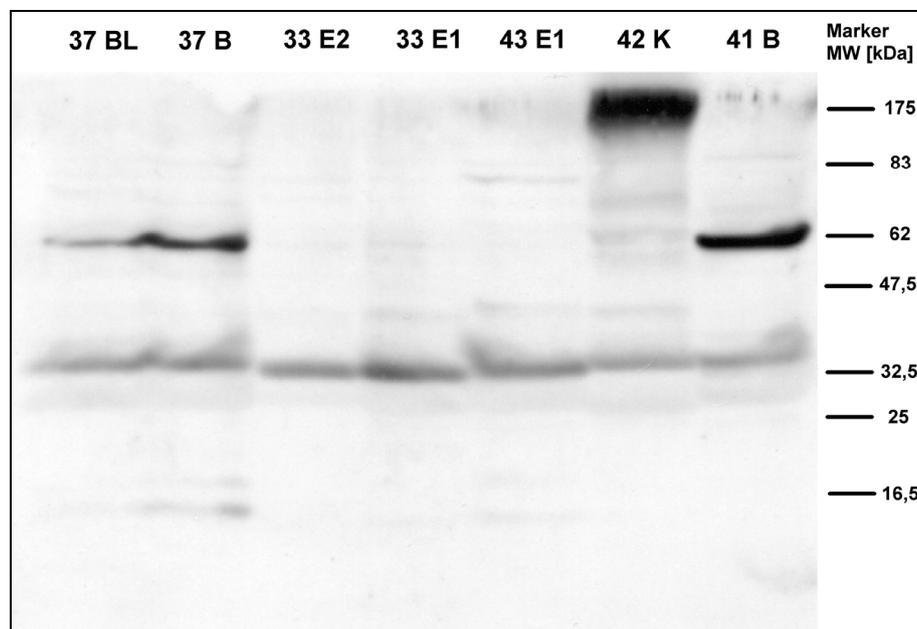


Abb. 3.7: Western-Blot der PS-II-Proteinkomplex-Extrakte: 37 BL = *Vicia faba* mit künstlicher Zusatzbelichtung, 37 B = *Vicia faba* ohne künstliche Zusatzbelichtung, 33 E2 = *Pisum sativum* var. *Maiperle*, 33 E1 = *Pisum sativum* var. *Feltham first*, 43 E1 = *Pisum sativum* var. *Feltham first*, 42 K = *Lactuca sativa*, 41 B = *Vicia faba* ohne künstliche Zusatzbelichtung, Marker MW = Molekulargewicht (kDa).

Die Bande oberhalb von 175 kDa bei dem PS-II-Proteinkomplex-Extrakt von *Lactuca sativa* (42 K) ist wahrscheinlich auf einen nicht aufgetrennten Proteinkomplex zurückzuführen, in

dem auch D1-Protein enthalten ist. Hier kam es wohl aufgrund von Aggregatbildung zu keiner vollständigen Auftrennung des PS-II-Proteinkomplexes in der SDS-PAGE.

3.2.2 Nachweis von D1-Protein in PS-II-Proteinkomplexen aus nach Cohen & Baxter (1990) hergestellten Thylakoiden

3.2.2.1 Vergleich der PS-II-Proteinkomplexe über SDS-PAGE

Alle 16 untersuchten PS-II-Proteinkomplex-Extrakte aus nach Cohen & Baxter (1990) isolierten Thylakoiden der vier untersuchten Pflanzenspezies *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Lactuca sativa* und *Spinacea oleracea* (s. Abb. 3.8, Bahnen 1-9 und 11-17) zeigten reproduzierbar ein ähnliches Proteinbandenmuster bei der Auftrennung über die SDS-PAGE. Es ließen sich 4 Hauptproteinbanden finden: auf der Höhe von ca. 69 kDa, 39 kDa, 33 kDa und 9 kDa. Zusätzlich waren noch andere schwächere Banden auf dem SDS-Polyacrylamidgel zu sehen (s. Abb. 3.8).

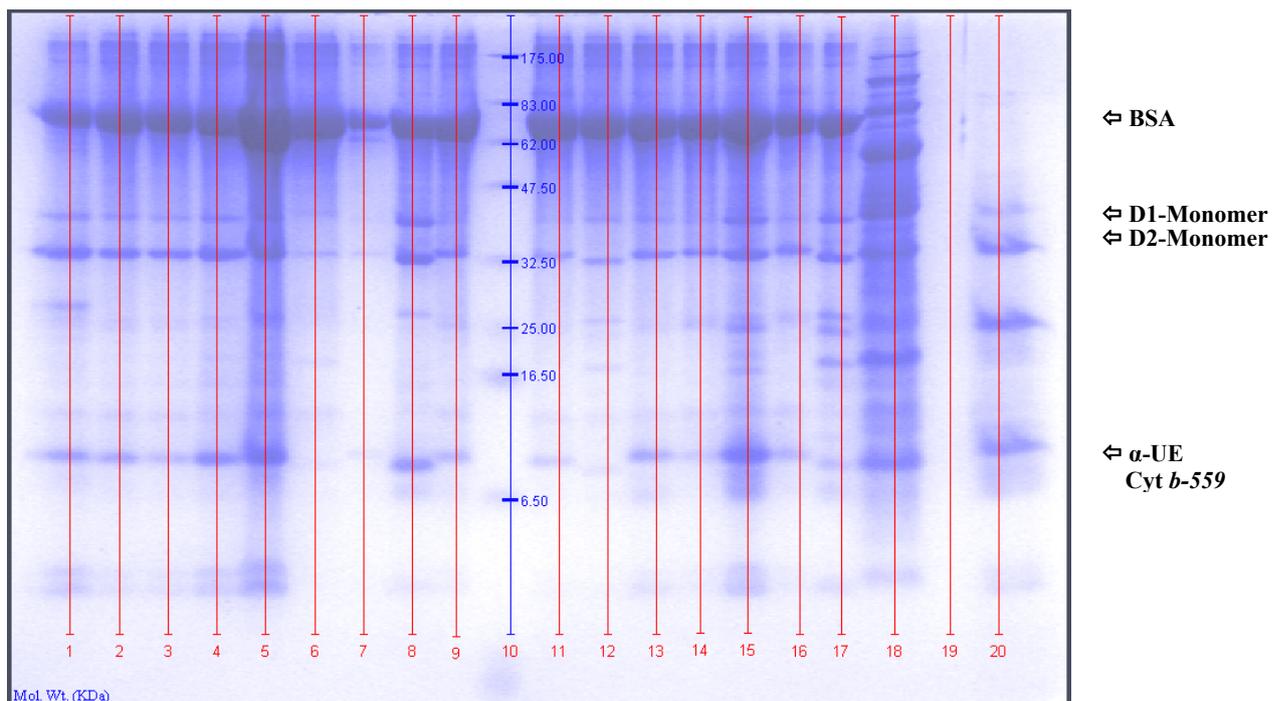


Abb. 3.8: SDS-PAGE von PS-II-Proteinkomplex-Extrakten, die nach der Thylakoidisolationsmethode von Cohen & Baxter (1990) (Bahnen 1-9; 11-17), sowie Bassi *et al.* (1985) (Bahnen 18 und 20) isoliert wurden. Färbung Coomassie®, Beschriftung: Molekulargewicht der detektierten Banden in kDa, rote Striche und Zahlen: Markierung und Nummerierung der Bahnen.

PS-II-Proteinkomplex-Extrakte von:

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Extrakt	PS II 1 E1	PS II 2 E1	PS II 3 E1	PS II 4 E1	PS II 5 E1	PS II 7 S	PS II 10 B	PS II 11 K	PS II 12 E1	Marker
Bahn	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Extrakt	PS II 13 E1	PS II 14 K	PS II 15 B	PS II 16 E2	PS II 17 B	PS II 18 E2	PS II 21 K	PS II 6 S	frei	PS II 9 B+

PS II = PS-II-Proteinkomplex-Extrakt, Zahl = Nummer des Extraktes, B = *Vicia faba*, E1 = *Pisum sativum* var. *Feltham first*, E2 = *Pisum sativum* var. *Maiperle*, K = *Lactuca sativa*. L = Anzucht mit künstlicher Zusatzbelichtung, ohne L = Anzucht ohne künstliche Zusatzbelichtung (s. Anhang 7.1).

Besonders auffällig war bei allen Extrakten die sehr starke Proteinbande bei ca. 69 kDa. Diese war hauptsächlich dem Protein BSA zuzuordnen, das bei dieser Extraktionsmethode im Überschuss als Blocking-Protein für die Proteasen zugesetzt wurde (s. Abschn. 2.3.1).

Aussagen über eventuell vorhandene D1/D2-Dimere, die bei denjenigen PS-II-Proteinkomplexen von *Vicia faba* gefunden wurden, die nach der Thylakoidisolationmethode von Piletskaya *et al.* (1997) isoliert worden waren, konnten hier aufgrund der Überlagerung durch das BSA nicht gemacht werden.

Auch hier zeigten sich zwei nahe beieinander liegende Banden auf der Höhe von ca. 33 und 39 kDa. Die dem D1-Protein zuzuordnende Bande bei ca. 39 kDa (s. Abschn. 3.2.1.1) war bei allen untersuchten Extrakten, im Gegensatz zu den PS-II-Proteinkomplexen aus Piletskaya-Thylakoidisolaten, nur sehr schwach nachzuweisen. Die untere Bande bei ca. 33 kDa, bei der es sich um D2-Protein handelte (s. Abschn. 3.2.1.1), war dagegen bei allen Extrakten deutlich stärker vertreten als das D1-Protein. Auch hier fanden sich Proteinbanden auf der Höhe von ca. 9 kDa, die wahrscheinlich der α -Untereinheit des Cytochroms *b-559* zuzuordnen sind (s. Abschn. 3.2.1.1). Bei einigen PS-II-Proteinkomplex-Extrakten konnten auch Proteinbanden im Bereich von ca. 4,5 kDa und damit nach Nanba und Satoh (1987), Vacha *et al.* (1995) und Komenda *et al.* (2002) höchstwahrscheinlich die β -Untereinheit des Cytochroms *b-559* detektiert werden (s. Abschn. 3.2.1.1).

Der Vergleich der verschiedenen Pflanzenspezies ergab hier keine signifikanten Unterschiede.

3.2.2.2 Western-Blotting von PS-II-Proteinkomplexen

Über den Western-Blot-Nachweis mit spezifischem Anti-D1-Antikörper konnte bei keiner der Pflanzenspezies *Lactuca sativa*, *Vicia faba* und *Pisum sativum* D1-Protein in den PS-II-Proteinkomplex-Extrakten, die aus nach Cohen & Baxter (1990) isolierten Thylakoiden aufgereinigt wurden, nachgewiesen werden (Ergebnisse hier nicht dargestellt).

3.2.3 Nachweis von D1-Protein in PS-II-Proteinkomplexen aus nach Bassi *et al.* (1985) hergestellten Thylakoiden

Die beiden nach der Thylakoidisolationmethode von Bassi *et al.* (1985) aufgereinigten PS-II-Proteinkomplex-Extrakte (s. Abb. 3.8, Bahnen 18 und 20) zeigten in der SDS-PAGE ein deutlich anderes Proteinmuster als die nach der Thylakoidisolationmethode von Cohen & Baxter (1990) und Piletskaya *et al.* (1997) aufgereinigten PS-II-Proteinkomplex-Extrakte. Hier fehlte die starke Bande auf der Höhe von ca. 69 kDa, die bei den Cohen & Baxter-Isolaten auf das BSA zurückzuführen war.

Beim PS-II-Extrakt aus *Spinacea oleracea* (PS II 6 S, s. Abb. 3.8, Bahn 18) waren deutliche Proteinbanden auf der Höhe von ca. 76, 62, 39, 33, 18 und 9 kDa zu sehen. Hier war der Gehalt an Photosystem-II-Proteinen deutlich höher als bei den Cohen & Baxter-Proteinkomplex-Extrakten. Da bei dieser Extraktionsmethode kein BSA, sondern Protease-Inhibitoren verwendet wurden, war hier eine genaue Bestimmung des Gehaltes an Photosystem-II-Proteinen über den Bradford-Test möglich. Daher kann die Bande auf der Höhe von ca. 62 kDa den D1/D2-Dimeren zugeordnet werden (Nakajima *et al.*, 1995; Vacha *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 1997a und 1997b).

Der PS-II-Proteinkomplex aus *Vicia faba* (s. Abb. 3.8, Bahn 20) konnte dagegen in Hauptproteinbanden von ca. 39, 33, 25 und 9 kDa aufgetrennt werden.

Bei beiden untersuchten Extrakten sind die Banden auf der Höhe von ca. 39 und 33 kDa, wie in Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben, dem D1- und D2-Protein zuzuordnen; ebenso können die Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von ca. 9 kDa wahrscheinlich der α -Untereinheit des Cytochroms *b-559* zugeordnet werden (s. Abschn. 3.2.1.1). Der PS-II-Proteinkomplex-Extrakt aus *Vicia faba* (s. Abb. 3.8, Bahn 20) zeigte im Gegensatz zu dem aus *Spinacea oleracea* (s. Abb. 3.8, Bahn 18) einen deutlich geringeren Gehalt an PS-II-Proteinen.

3.2.4 Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse im Hinblick auf die weiteren Aufreinigungsschritte des D1-Proteins aus dem PS-II-Proteinkomplex

Da im Western-Blot in den PS-II-Proteinkomplexen, die aus nach der Cohen & Baxter-Methode (1990) isolierten Thylakoiden aufgereinigt wurden, bei keiner der drei untersuchten Pflanzenspezies D1-Protein zu detektieren war, wurde diese Thylakoidaufreinigungsmethode nicht weiter verfolgt. Das D1-Protein war bei diesen Extrakten in so geringen Mengen vorhanden, dass es mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden konnte. Dies ist sehr wahrscheinlich auf den hohen Gehalt an BSA in den PS-II-Proteinkomplex-Extrakten zurückzuführen, das als Proteaseinhibitor während der Thylakoidisolation im Überschuss zugesetzt wurde. Durch die Zugabe des BSA lässt sich bei diesen Extrakten der Proteingehalt der enthaltenen PS-II-Proteinkomplexe nicht genau bestimmen, da ein Großteil des nachgewiesenen Proteingehaltes nach Bradford (s. Abschn. 2.8) dem im Überschuss vorhandenen BSA zuzuschreiben ist. Dabei kann über die Proteinbestimmung kein Rückschluss auf den Gehalt an PS-II-Proteinkomplexen in diesen Extrakten erfolgen. Damit lässt sich auch der sehr geringe Anteil von D1-Protein in den SDS-Polyacrylamidgelen erklären. Wegen dieses störenden Einflusses des verwendeten BSA und der damit verbundenen starken Verringerung der Ausbeute an D1-Protein bei der

Thylakoidisolationmethode nach Cohen & Baxter (1990) wurde diese Isolationsmethode für die Aufreinigung von D1-Protein als ungeeignet bewertet und von hier ab nicht weiter verwendet.

Der sehr starke Unterschied in der Zusammensetzung an Photosystem-II-Proteinen der beiden untersuchten PS-II-Proteinkomplex-Extrakte (s. Abschn. 3.2.3) führte neben den zuvor erhaltenen Ergebnissen (s. Abschn. 3.1) dazu, dass auch die Thylakoidisolationmethode nach Bassi *et al.* (1985) als nicht geeignet für die Isolation von D1-Protein erkannt wurde und daher nicht weiter verfolgt wurde.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im weiteren Verlauf der Arbeit nur noch mit der Thylakoidisolationmethode nach Piletskaya *et al.* (1997) weitergearbeitet. Bei dieser Methode wurden keine Proteine als Protease-Blocker zugesetzt, so dass hier eine direkte Bestimmung der Menge an enthaltenen PS-II-Proteinen in den Extrakten erfolgen konnte.

Bei den drei getesteten Pflanzenspezies stach *Vicia faba* aufgrund des Nachweises von D1/D2-Dimeren heraus, die bei den anderen beiden Pflanzenspezies nicht gefunden werden konnten. Weil diese Ergebnisse aber noch keinen Rückschluss auf die Funktionalität der im Folgenden zu isolierenden D1-Proteine bei den verschiedenen Pflanzenspezies zuließen, wurden für die weiteren Aufreinigungsschritte alle drei Pflanzenspezies parallel untersucht, wobei *Vicia faba* ein besonderes Augenmerk galt.

Da sich bei *Vicia faba* Unterschiede im Gehalt an D1/D2-Dimeren in Abhängigkeit von der Anzucht mit oder ohne künstliche Zusatzbelichtung zeigten, wurden beide Anzuchtmethoden weiterverfolgt, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Aussage darüber getroffen werden konnte, ob die Existenz von D1-Protein in Form von Dimeren von Vorteil für den Erhalt der Bindefähigkeit des isolierten D1-Proteins zu PS-II-Herbiziden sein könnte. An dieser Stelle war in die Überlegungen einzubeziehen, dass das aufgereinigte D1-Protein von *Vicia faba* im Weiteren eine Alternative zu den beiden anderen Pflanzenspezies darstellen könnte, da mit den Dimeren eventuell eine Bindefähigkeit zu den PS-II-Herbiziden gezeigt werden könnte, wenn bei den D1-Monomeren kein Bindungsnachweis erfolgen kann.

Bezüglich der beiden Varietäten von *Pisum sativum*, wurde die Entscheidung getroffen, vorwiegend mit der Varietät *Feltham first* weiterzuarbeiten, da sich keine Unterschiede im D1-Proteingehalt zeigten und die Varietät *Maiperle* bei der Anzucht eine geringere Ausbeute an Pflanzenmaterial lieferte.

3.3 Aufreinigung des D1-Proteins aus dem PS-II-Proteinkomplex

Für die Aufreinigung des D1-Proteins aus den PS-II-Proteinkomplexen wurden die beiden Fast-protein-liquid-chromatography-Aufreinigungsmethoden (FPLC-Aufreinigungsmethoden) nach Sharma *et al.* (1997a) und Piletskaya *et al.* (1997) getestet (s. Abschn. 2.5.1 und 2.5.2) sowie die drei Pflanzenspezies *Vicia faba*, *Pisum sativum* und *Lactuca sativa* miteinander verglichen, um auch hier die am besten geeignete Methode und die bestmögliche Pflanzenspezies für die weitere Verwendung des D1-Proteins als biologische Einheit im SPR-Biosensor zu ermitteln.

3.3.1 Nachweis von nach der Methode von Sharma *et al.* (1997a) aufgereinigtem D1-Protein über SDS-PAGE und Western-Blotting

Zur weiteren Aufreinigung des D1-Proteins aus den PS-II-Proteinkomplexen wurden diese mittels Reversed phase Fast protein liquid chromatography (RP-FPLC), wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben, entsprechend der Methode von Sharma *et al.* (1997a) aufgetrennt. Die Aufreinigungen wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blotting auf den Nachweis von D1-Protein untersucht. Zur Überprüfung des Vorhandenseins von D1-Protein wurden alle FPLC-Fraktionen über den gesamten Lauf gesammelt und kontrolliert um herauszufinden, bei welchem Lösungsmittel-Gradienten das D1-Protein eluiert und ob es sich um eine saubere Aufreinigung handelt. Im Folgenden sind exemplarisch für die durchgeführten Versuche die Ergebnisse von jeweils einer FPLC-Aufreinigung jeder der drei untersuchten Pflanzenspezies dargestellt.

3.3.1.1 D1-Protein-Aufreinigung von *Vicia faba*

Die Aufreinigung für *Vicia faba* ist exemplarisch durch den PS-II-Proteinkomplex-Extrakt PS II 53 BL dargestellt. In den Abbildungen 3.9 und 3.10 sind die Auftrennungen der Fraktionen (F) 22-55 über SDS-PAGE dargestellt. Die Abbildungen zeigen, dass über Reversed phase FPLC eine Auftrennung des komplexen PS-II-Proteinkomplexes möglich war. Die Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen änderte sich mit dem Gradienten der mobilen Phase deutlich, wobei das D1-Protein (Monomere und Dimere) im Bereich von 50-75 % 1-Propanol eluierte. Dabei konnten jedoch die D1-Monomere nicht sauber von den D1/D2-Dimeren sowie dem D2-Protein getrennt werden. In den Fraktionen 34-44 wurden in einem Molekulargewichtsbereich von ca. 36 kDa (s. Abb. 3.9 und 3.10) deutliche Proteinbanden detektiert. Diese wurden über den mit dem Anti-D1-Antikörper durchgeführten Western-Blot erfolgreich als D1-Protein identifiziert (s. Abb. 3.11).

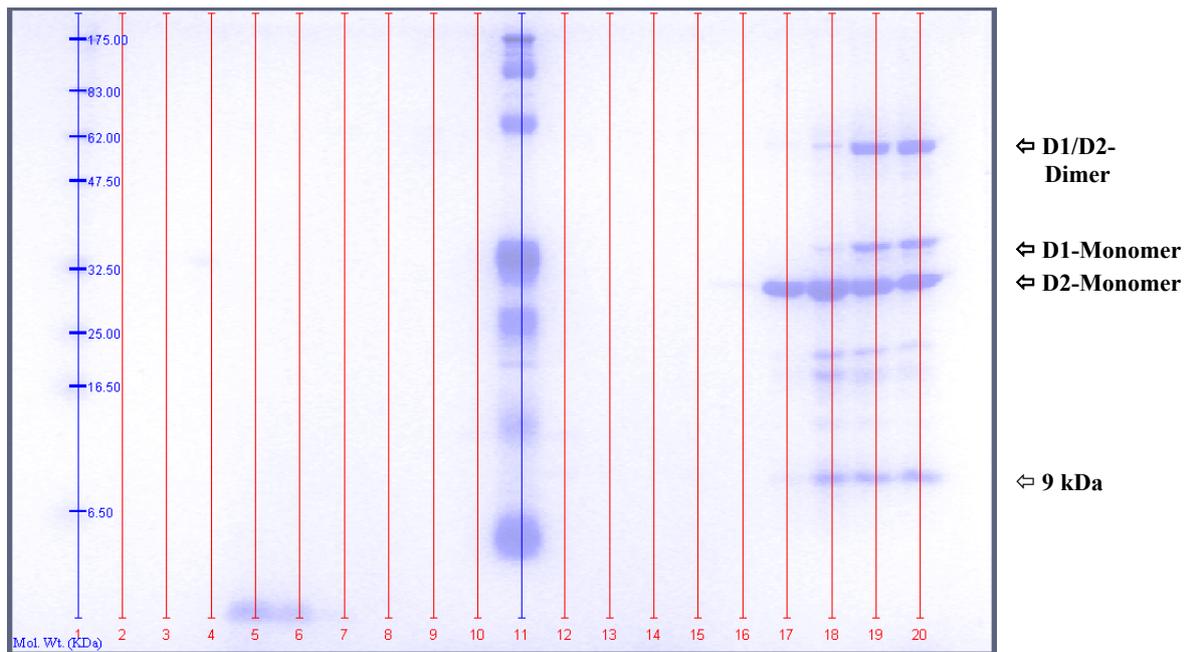


Abb. 3.9: SDS-PAGE von FPLC-Fractionen eines nach Sharma *et al.* (1997a) aufgetrennten PS-II-Proteinkomplex-Extraktes von *Vicia faba* (PS II 53 BL). Färbung Coomassie®, Beschriftung: Molekulargewicht der detektierten Banden in kDa, rote Striche und Zahlen: Markierung und Nummerierung der Bahnen.

Aufgetragene Proben:

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Probe	Marker	psbA 1 μ l =0,25 pmol	psbA 5 μ l =1,25 pmol	psbA 10 μ l =2,5 pmol	F 22	F 23	F 24	F 25	F 26	F 27
Bahn	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Probe	Marker	F 28	F 29	F 30	F 31	F 32	F 33	F 34	F 35	F 36

psbA = psbA-Proteinstandard (pmol), F = Fraktion, Zahl = Fraktionsnummer.

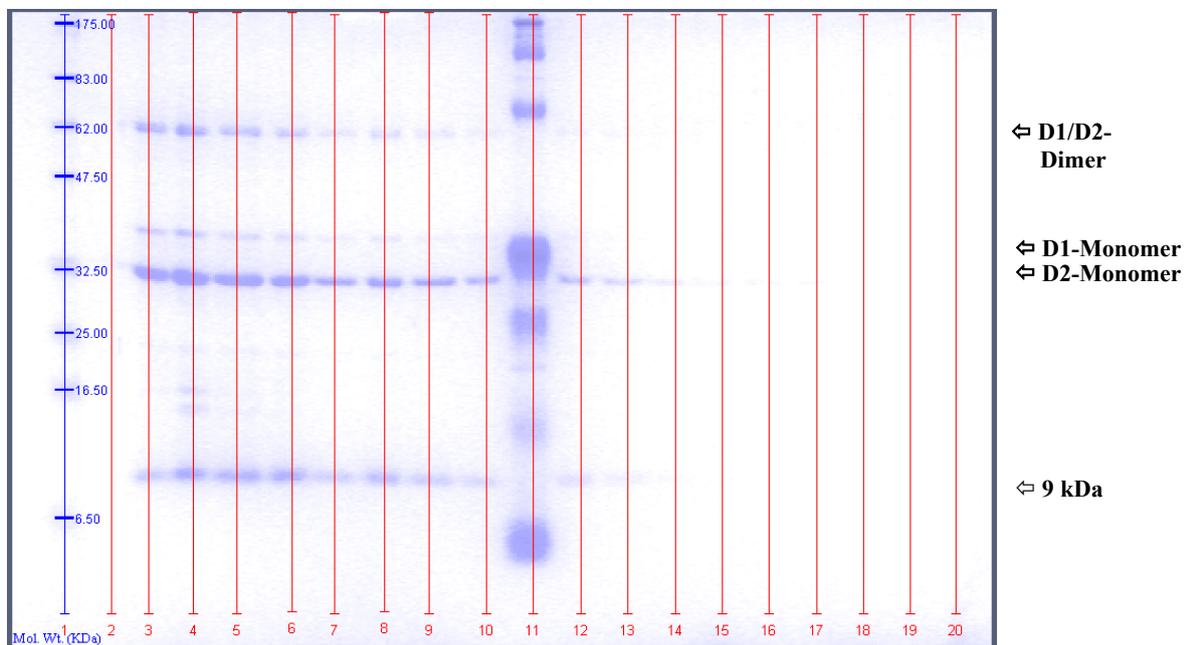


Abb. 3.10: SDS-PAGE von FPLC-Fractionen eines nach Sharma *et al.* (1997a) aufgetrennten PS-II-Proteinkomplex-Extraktes von *Vicia faba* (PS II 53 BL). Färbung Coomassie®, Beschriftung: Molekulargewicht der detektierten Banden in kDa, rote Striche und Zahlen: Markierung und Nummerierung der Bahnen.

Aufgetragene Proben:

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Probe	Marker	psbA 5 μ l =1,25 pmol	F 37	F 38	F 39	F 40	F 41	F 42	F 43	F 45
Bahn	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Probe	Marker	F 46	F 47	F 48	F 50	F 51	F 52	F 53	F 54	F 55

psbA = psbA-Proteinstandard (pmol), F = Fraktion, Zahl = Fraktionsnummer.

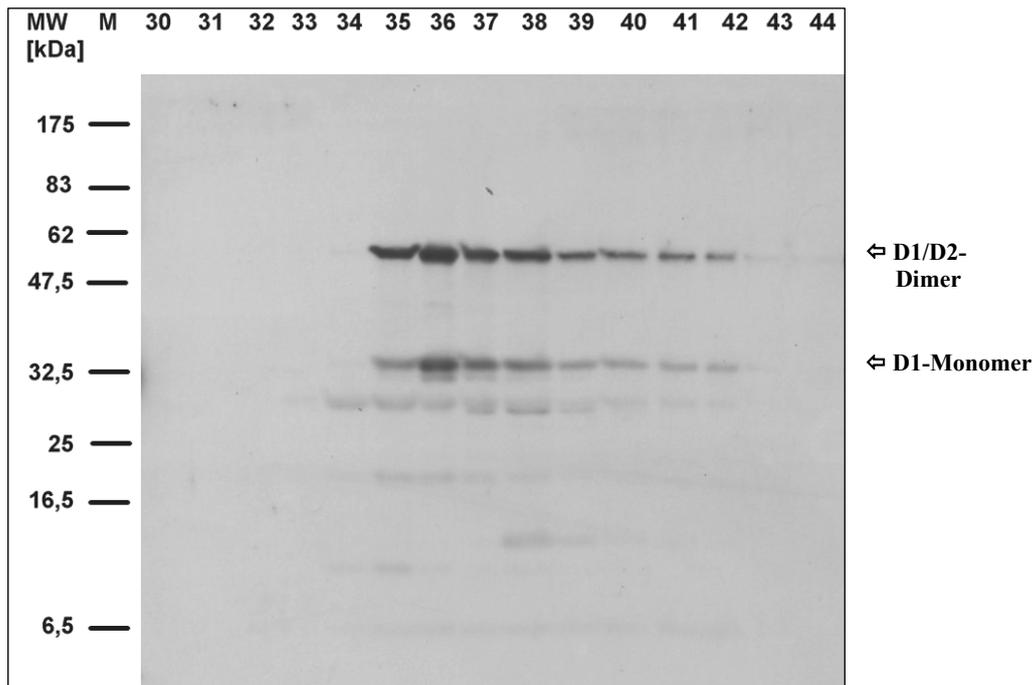


Abb. 3.11: Western-Blot von FPLC-Fractionen eines nach Sharma *et al.* (1997a) aufgetrennten PS-II-Proteinkomplex-Extraktes von *Vicia faba* (PS II 53 BL). 30-44 = FPLC-Fractionen 30–44, MW = Molekulargewicht [kDa], M = Marker.

Zusätzlich konnte in den Fraktionen 32-52 noch eine weitere, stärkere Bande auf der Höhe von ca. 30 kDa nachgewiesen werden, die nach der Literatur (Nixon *et al.*, 1986; Barber *et al.*, 1987; Nanba und Satoh, 1987; Vacha *et al.*, 1995; Nakazato *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 1997a und 1997b; Kuhl *et al.*, 2000; Komenda *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2004; Mizusawa *et al.*, 2004) dem D2-Protein zuzuordnen ist. In den Fraktionen 33-47 (s. Abb. 3.9 und 3.10) wurde eine Bande in einem Molekulargewichtsbereich von ca. 60 kDa gefunden. Über den Antikörper-Nachweis mit dem Western-Blot konnte dieses Protein in den Fraktionen 34-44 als ein D1/D2-Dimer identifiziert werden (s. Abb. 3.11).

In den Fraktionen 33-47 war noch ein Protein bei ca. 9 kDa zu finden, wobei es sich nach der Literatur wahrscheinlich um ein prozessiertes D1-Fragment (Greenberg *et al.*, 1987; Canovas und Barber, 1993; Kanervo *et al.*, 1998; Wiklund *et al.*, 2001; Agrisera, 2004) oder um die α -Untereinheit des Cytochroms *b*-559 (Nixon *et al.*, 1986; Barber *et al.*, 1987; Nanba und Satoh, 1987; Vacha *et al.*, 1995; Nakazato *et al.*, 1996; Kuhl *et al.*, 2000; Komenda *et al.*, 2002; Mizusawa *et al.*, 2004) handelt. Über SDS-PAGE konnten in den Fraktionen 34-36 noch zusätzliche Proteine im Bereich von ca. 18 und 21 kDa nachgewiesen werden, was auf eine in diesen Fraktionen nicht ausreichende Aufreinigung des D1-Proteins von anderen im PS-II-Proteinkomplex vorhandenen Proteinen oder auf die Anwesenheit von D1-Protein-Abbaufragmenten schließen lässt.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Western-Blots sollte ein *psbA*-Protein-Standard, bestehend aus einem rekombinanten mit Histidin-markierten D1-Protein aus *Synechocystis* PCC 6803, (Agrisera, Vännäs, S) verwendet werden. Anhand der Versuche zeigte sich, dass es sich nicht, wie vom Hersteller angegeben, um einen Standard des D1-Proteins handelte, sondern um einen PS-II-Proteinkomplex (hier nicht dargestellt). Aufgrund dessen war eine genaue Bestimmung der in den FPLC-Fractionen nachgewiesenen Mengen an D1-Protein nicht möglich (s. Abschn. 2.13.4).

Abbildung 3.12 zeigt exemplarisch das Chromatogramm der FPLC-Auftrennung des PS-II-Proteinkomplex-Extraktes PS II 53 BL von *Vicia faba*.

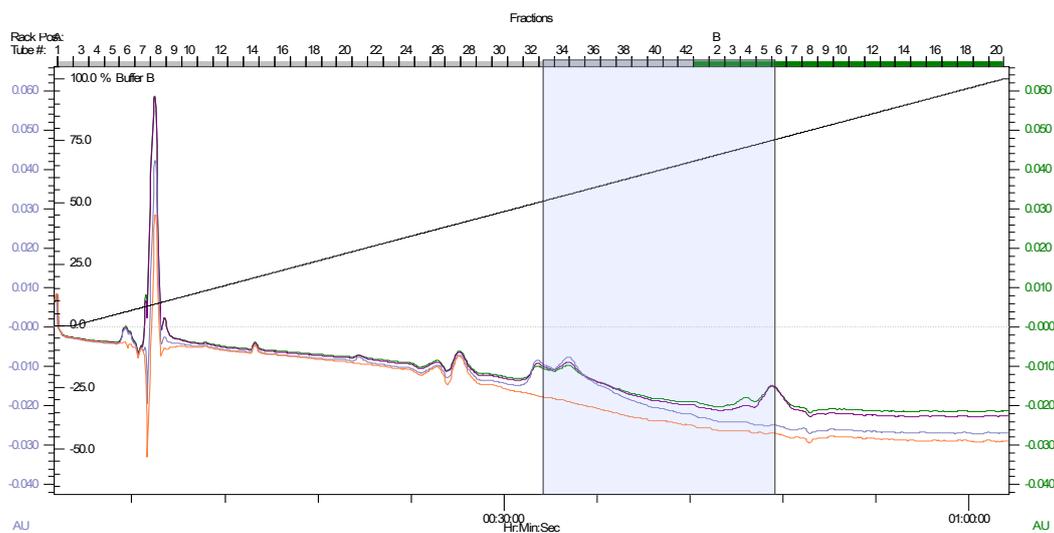


Abb. 3.12: FPLC-Chromatogramm der Auftrennung eines PS-II-Proteinkomplex-Extraktes von *Vicia faba* (PS II 53 BL) mit einer RP-C18-Säule (Grace Vydac, Hesperia, USA) und einem linearen Gradienten von 5 % Essigsäure zu 1-Propanol, nach Sharma *et al.* (1997a). Y-Achse rechts: Absorption (AU) bei 254 nm, y-Achse links: Absorption (AU) bei 280 nm, x-Achse unten: Zeit in h:min:s, x-Achse oben: gesammelte Fraktionsnummer, schwarze Linie: Gradient in % 1-Propanol; grüne, lila, blaue, orange Linie: Absorptionsspektren aufgenommen bei 254, 260, 280 und 360 nm.

Bei der Betrachtung des FPLC-Chromatogramms lässt sich der zweite Peak des Doppelpeaks bei ca. 35 min, zusammen mit dem auslaufenden rechten Bereich (s. Abb. 3.12, blau markierter Bereich), dem über SDS-PAGE und Western-Blotting nachgewiesenen D1-Protein zuordnen. Dieser Bereich entspricht einem Prozentsatz an 1-Propanol von ca. 50-75 %. Insgesamt zeigte sich jedoch in den Chromatogrammen eine sehr geringe Absorption durch die Proteine, die im Bereich von 10 mAU lag. Bei allen untersuchten PS-II-Proteinkomplex-Extrakten von *Vicia faba* konnte das D1-Protein in diesem Bereich über SDS-PAGE und Western-Blotting nachgewiesen werden.

3.3.1.2 D1-Protein-Aufreinigung von *Pisum sativum*

Die Aufreinigung für *Pisum sativum* ist exemplarisch durch den PS-II-Proteinkomplex-Extrakt PS II 55 E1 dargestellt. Der Nachweis der Proteine in den FPLC-Fractionen über SDS-PAGE wird in den Abbildungen 3.13 und 3.14 gezeigt. Die Ergebnisse belegten, dass auch hier über die gewählte Reversed-phase-FPLC-Methode eine Auftrennung des komplexen PS-II-Proteinkomplexes möglich war. Das D1-Protein als Monomer eluierte dabei in einem Prozentbereich des Gradienten der mobilen Phase von 43-70 % 1-Propanol. Dabei konnten jedoch die D1-Monomere nicht sauber von dem D2-Protein sowie von einem Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 9 kDa getrennt werden. Bei letzterem handelt es sich nach der Literatur wahrscheinlich um ein prozessiertes D1-Fragment oder um die α -Untereinheit des Cytochroms *b-559*, die beide in diesem Molekulargewichtsbereich zu finden sind (s. Abschn. 3.3.1.1). Im parallel durchgeführten SDS-Polyacrylamidgel und Western-Blot konnte die Proteinbande im Molekulargewichtsbereich von ca. 36 kDa in den Fraktionen 30-44 über den Anti-D1-Antikörper-Nachweis spezifisch als D1-Protein identifiziert werden (s. Abb. 3.13 bis 3.16). Der Nachweis war jedoch sowohl im SDS-Polyacrylamidgel wie auch im Western-Blot schwächer als bei *Vicia faba* (s. Abb. 3.9, 3.10 und 3.11).

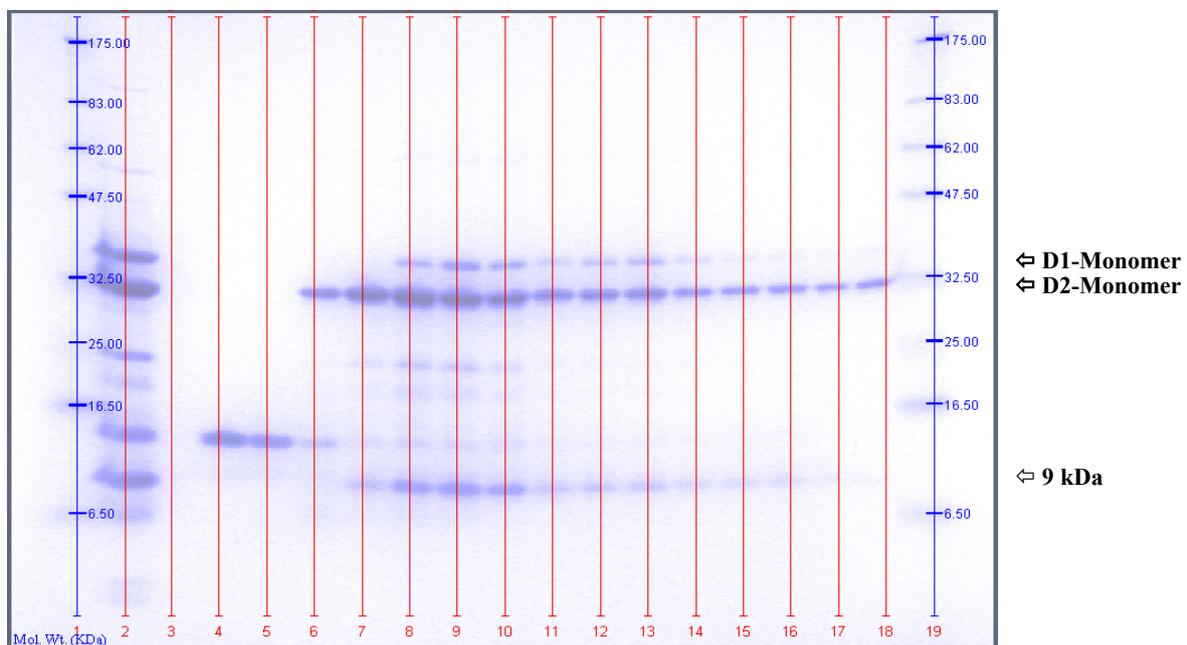


Abb. 3.13: SDS-PAGE von FPLC-Fractionen eines nach Sharma *et al.* (1997a) aufgetrennten PS-II-Proteinkomplex-Extraktes von *Pisum sativum* var. *Feltham first* (PS II 55 E1). Färbung Coomassie®, Beschriftung: Molekulargewicht der detektierten Banden in kDa, rote Striche und Zahlen: Markierung und Nummerierung der Bahnen.

Aufgetragene Proben:

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Probe	Marker	PS II 55E1 16,8 µg	F 25	F 26	F 27	F 28	F 29	F 30	F 31	F 32
Bahn	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Probe	F 33	F 34	F 35	F 36	F 37	F 38	F 39	F 40	F 41	Marker

F = Fraktion, Zahl = Fraktionsnummer, PS II = PS-II-Proteinkomplex-Extrakt (µg) (s. Anhang 7.1).

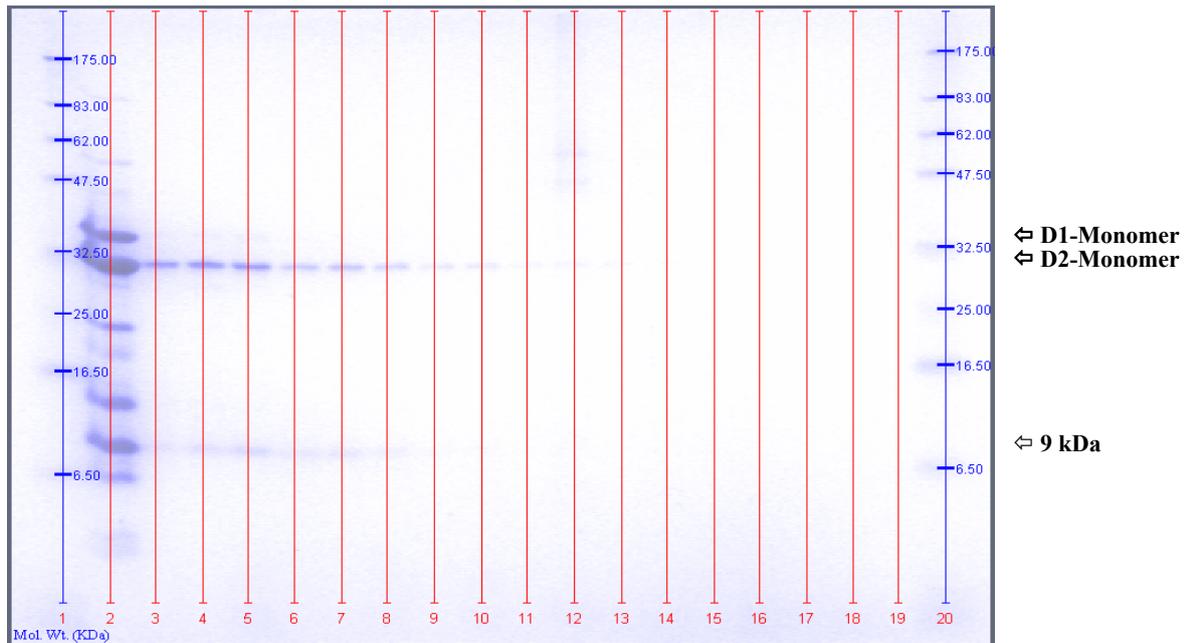


Abb. 3.14: SDS-PAGE von FPLC-Fractionen eines nach Sharma *et al.* (1997a) aufgetrennten PS-II-Proteinkomplex-Extraktes von *Pisum sativum* var. *Feltham first* (PS II 55 E1). Färbung Coomassie®, Beschriftung: Molekulargewicht der detektierten Banden in kDa, rote Striche und Zahlen: Markierung und Nummerierung der Bahnen.

Aufgetragene Proben:

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Probe	Marker	PS II 55E1 16,8 µg	F 42	F 43	F 44	F 45	F 46	F 47	F 48	F 49
Bahn	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Probe	F 50	F 51	F 52	F 53	F 54	F 55	F 56	F 57	F 58	Marker

F = Fraktion, Zahl = Fraktionsnummer, PS II = PS-II-Proteinkomplex-Extrakt (µg) (s. Anhang 7.1).

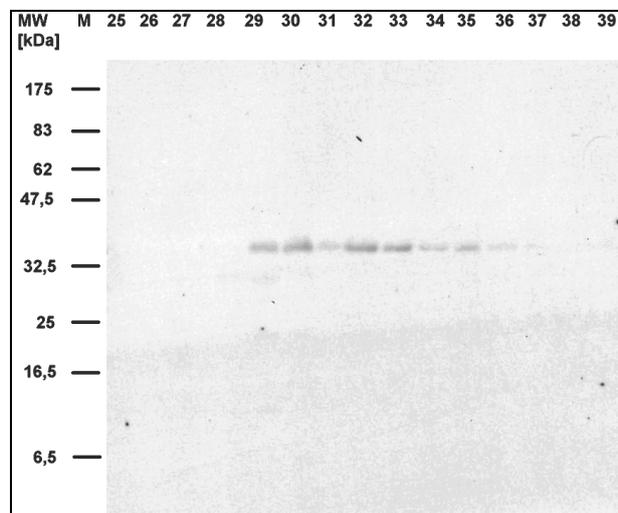


Abb. 3.15: Western-Blot von FPLC-Fractionen eines nach Sharma *et al.* (1997a) aufgetrennten PS-II-Proteinkomplex-Extraktes von *Pisum sativum* var. *Feltham first* (PS II 55 E1); 25-39 = FPLC-Fractionen 25-39, MW = Molekulargewicht [kDa], M = Marker.

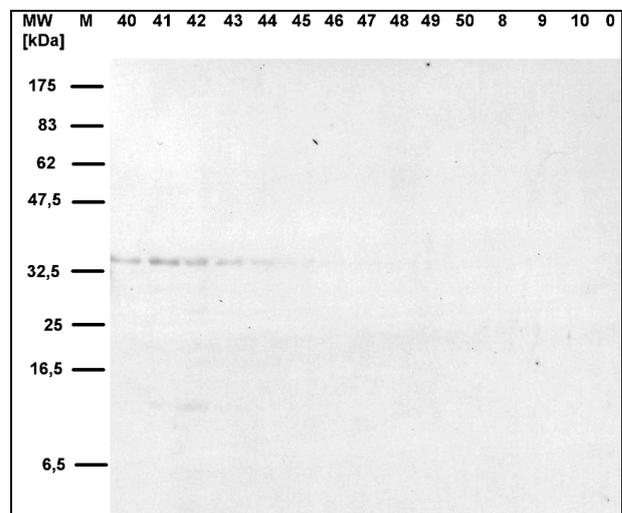


Abb. 3.16: Western-Blot von FPLC-Fractionen eines nach Sharma *et al.* (1997a) aufgetrennten PS-II-Proteinkomplex-Extraktes von *Pisum sativum* var. *Feltham first* (PS II 55 E1); 40-50, 8-10 = FPLC-Fractionen 40-50 und 8-10, 0 = leere Bahn, MW = Molekulargewicht [kDa], M = Marker.

Auch hier konnte im SDS-Polyacrylamidgel bei ca. 30 kDa in den Fraktionen 28-53 eine Proteinbande gefunden werden, die deutlich stärker war als die bei ca. 36 kDa und die laut Literatur dem D2-Protein zugeordnet werden kann (s. Abschn. 3.3.1.1). Parallel zu diesen beiden Banden waren in den Fraktionen 29-33 kleinere Proteine von ca. 18 und 21 kDa zu finden, was auch hier auf die Anwesenheit von D1-Abbaufragmenten oder auf eine in diesen Fraktionen nicht ausreichende Aufreinigung des D1-Proteins von anderen im PS-II-Proteinkomplex vorhandenen Proteinen zurückgeführt werden könnte.

Im Gegensatz zu den Aufreinigungen von *Vicia faba* konnten hier keine Proteine im Molekulargewichtsbereich von ca. 60 kDa gefunden werden.

Auch bei *Pisum sativum* konnte in der chromatographischen Auftrennung des PS-II-Proteinkomplex-Extraktes der Nachweis des D1-Proteins dem Peak bei ca. 30 min sowie seiner auslaufenden Flanke, in der Abbildung 3.17 blau markiert, zugeordnet werden. Dieser Bereich entspricht einem 1-Propanol-Prozentsatz von ca. 43-70 %. Hier eluierte das D1-Protein also in einem breiteren Bereich als bei den PS-II-Proteinkomplex-Extrakten von *Vicia faba*. In diesem Konzentrationsbereich gelang bei allen durchgeführten FPLC-Aufreinigungen von *Pisum sativum* der Nachweis von D1-Protein im SDS-Polyacrylamidgel bzw. Western-Blot.

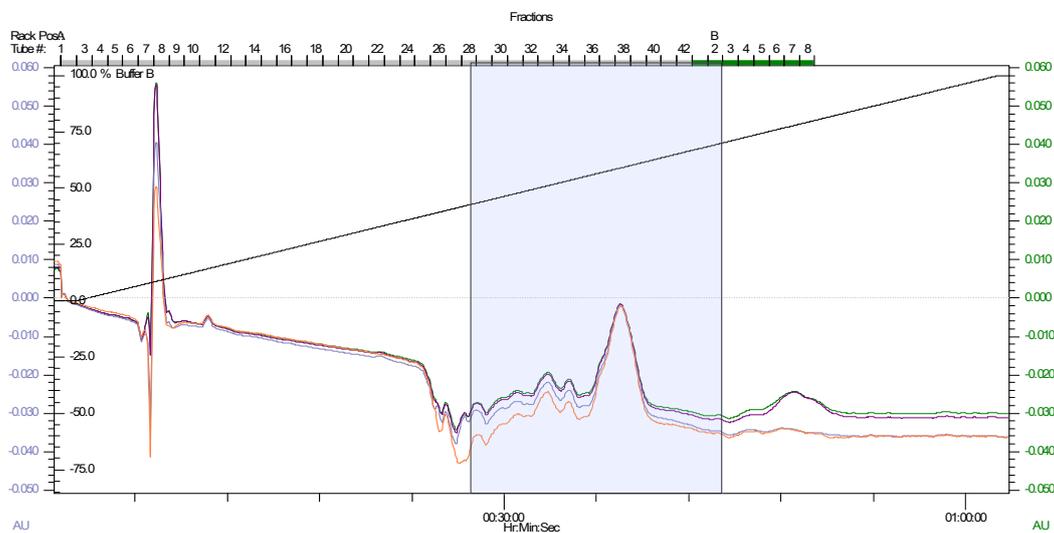


Abb. 3.17: FPLC-Chromatogramm der Auftrennung eines PS-II-Proteinkomplex-Extraktes von *Pisum sativum* (PS II 55 E1) mit einer RP-C18-Säule (Grace Vydac, Hesperia, USA) und einem linearen Gradienten von 5 % Essigsäure zu 1-Propanol, nach Sharma *et al.* (1997a). Y-Achse rechts: Absorption (AU) bei 254 nm, y-Achse links: Absorption (AU) bei 280 nm, x-Achse unten: Zeit in h:min:s, x-Achse oben: gesammelte Fraktionsnummer, schwarze Linie: Gradient in % 1-Propanol; grüne, lila, blaue, orange Linie: Absorptionsspektren aufgenommen bei 254, 260, 280 und 360 nm.

3.3.1.3 D1-Protein-Aufreinigung von *Lactuca sativa*

Am Beispiel von PS-II-Proteinkomplex-Extrakt PS II 54 KL ist die FPLC-Aufreinigung von *Lactuca sativa* dargestellt. Die Ergebnisse zeigten, dass auch hier über die gewählte Reversed-phase-FPLC-Methode eine Auftrennung des multimeren PS-II-Proteinkomplexes möglich war. Das D1-Protein in seiner monomeren Form koeluierte mit dem D2-Protein dabei in einem Prozentbereich des Gradienten der mobilen Phase von 43-67 % 1-Propanol. Im Gegensatz zu *Vicia faba* und *Pisum sativum* kam es zu keiner Koelution des D1-Proteins mit anderen Proteinen außer dem D2-Protein (s. Abb. 3.18).

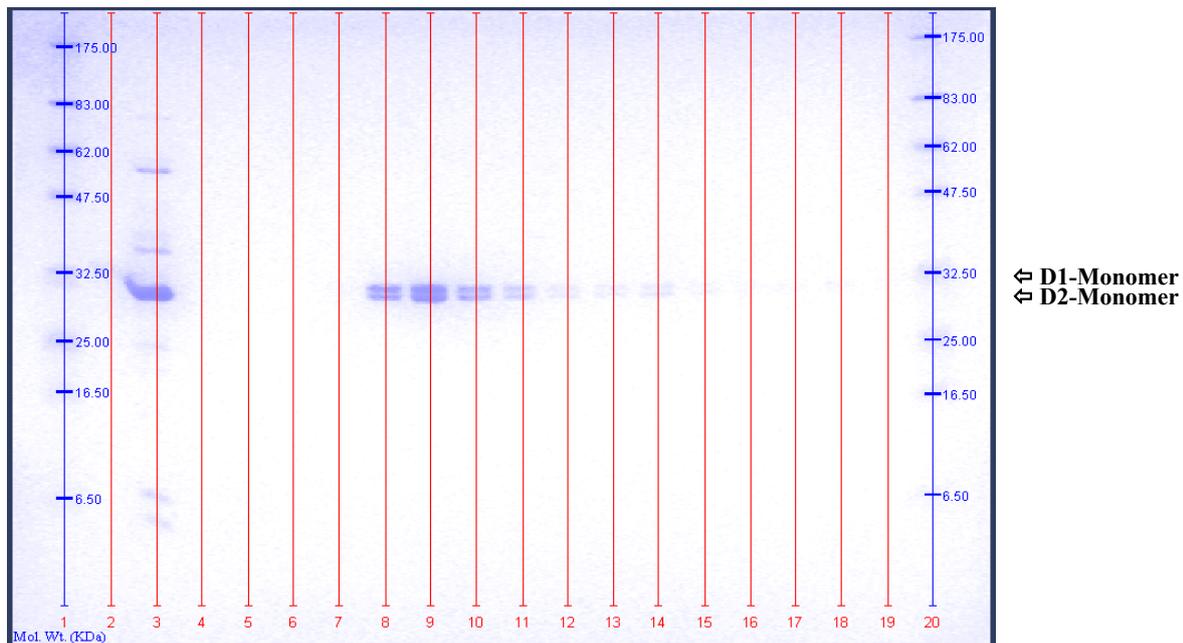


Abb. 3.18: SDS-PAGE von FPLC-Fractionen eines nach Sharma et al. (1997a) aufgetrennten PS-II-Proteinkomplex-Extraktes von *Lactuca sativa* (PS II 54 KL). Färbung Coomassie®, Beschriftung: Molekulargewicht der detektierten Banden in kDa, rote Striche und Zahlen: Markierung und Nummerierung der Bahnen.

Aufgetragene Proben:

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Probe	Marker	psbA 40 µl=10 pmol	PS II 54 KWL	F 25	F 26	F 27	F 28	F 29	F 30	F 31
Bahn	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Probe	F 32	F 33	F 34	F 35	F 36	F 37	F 38	F 39	F 40	Marker

psbA = psbA-Proteinstandard (pmol), F = Fraktion, Zahl = Fraktionsnummer.

In den Fraktionen 29-40 konnte eine nahe beieinander liegende Doppelbande bei einem Molekulargewicht von ca. 29 und 30 kDa im SDS-Polyacrylamidgel detektiert werden (s. Abb. 3.18). Über den parallel durchgeführten Western-Blot (s. Abb. 3.19) gelang die Identifikation der in der SDS-PAGE detektierten oberen Bande bei 30 kDa in den Fraktionen 30-42 als D1-Protein. Auch hier war der Nachweis sowohl im SDS-Polyacrylamidgel wie auch im Western-Blot viel schwächer als bei den Aufreinigungen von *Vicia faba* (s. Abb. 3.9, 3.10 und 3.11).

Der Nachweis des D1-Proteins in den Fraktionen 29-42 entspricht im FPLC-Chromatogramm (s. Abb. 3.20) dem Multipeak bei ca. 30 min (s. Abb. 3.20, blau markierter Bereich) und einer 1-Propanolkonzentration von 43-67 %. Damit konnte das D1-Protein in etwa demselben Bereich wie auch bei *Pisum sativum* eluiert werden. Bei allen durchgeführten D1-Protein-Aufreinigungen aus *Lactuca sativa* konnte das D1-Protein in diesem Bereich eluiert und über SDS-PAGE bzw. Western-Blotting detektiert werden.

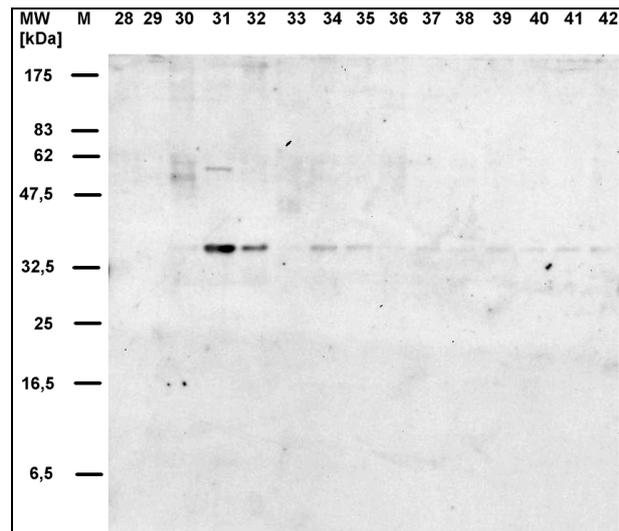


Abb. 3.19: Western-Blot von FPLC-Fractionen eines nach Sharma aufgetrennten PS-II-Extraktes von *Lactuca sativa* (PS II 54 KL). 28-42 = FPLC-Fractionen 28-42, MW = Molekulargewicht [kDa], M = Marker.

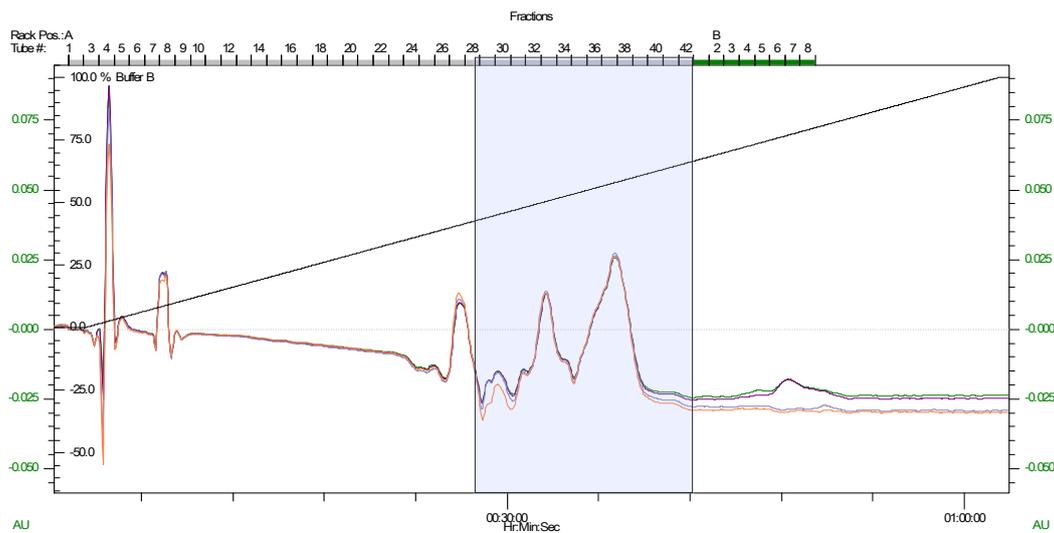


Abb. 3.20: FPLC-Chromatogramm der Auftrennung eines PS-II-Proteinkomplex-Extraktes von *Lactuca sativa* (PS II 54 KL) mit einer RP-C18-Säule (Grace Vydac, Hesperia, USA) und einem linearen Gradienten von 5 % Essigsäure zu 1-Propanol, nach Sharma *et al.* (1997a). Y-Achse rechts: Absorption (AU) bei 254 nm, y-Achse links: Absorption (AU) bei 280 nm, x-Achse unten: Zeit in h:min:s, x-Achse oben: gesammelte Fraktionsnummern, schwarze Linie: Gradient in % 1-Propanol; grüne, lila, blaue, orange Linie: Absorptionsspektren aufgenommen bei 254, 260, 280 und 360 nm.

3.3.1.4 Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse über SDS-PAGE und Western-Blotting im Hinblick auf die Aufreinigung des D1-Proteins über die Methode nach Sharma *et al.* (1997a)

Die drei exemplarisch aufgeführten FPLC-Aufreinigungen der Pflanzenspezies *Vicia faba*, *Pisum sativum* und *Lactuca sativa* standen stellvertretend für alle durchgeführten D1-Protein-Aufreinigungen nach der Methode von Sharma *et al.* (1997a).

Das D1-Protein konnte bei allen drei Pflanzenspezies im gleichen Bereich, bei einem Prozentsatz von 41-75 % 1-Propanol, eluiert werden; das Ergebnis stand damit in Übereinstimmung mit Werten aus der Literatur (Sharma *et al.*, 1997a). Eine Trennung des D1-Proteins von dem D2-Protein war bei allen drei Pflanzenspezies, wie bei Sharma *et al.* (1997a) beschrieben, nicht möglich.

Als auffällige Besonderheit unter den drei untersuchten Pflanzenspezies ist der Nachweis von D1/D2-Dimeren bei der Pflanzenspezies *Vicia faba* hervorzuheben. Bei keiner der durchgeführten FPLC-Aufreinigungen der PS-II-Proteinkomplex-Extrakte von *Pisum sativum* und *Lactuca sativa* konnten Dimere gefunden werden.

Bei allen FPLC-Aufreinigungen von *Vicia faba* eluierten reproduzierbar die D1-Monomere in einem 1-Propanol-Konzentrationsbereich von ca. 52–68 %. Die D1/D2-Dimere eluierten in einem breiteren Konzentrationsbereich von ca. 50-75 % 1-Propanol. Damit konnten die D1-Monomere und die D1/D2-Dimere nicht voneinander getrennt werden. Das D2-Protein koeluierte mit dem D1-Protein in einem 1-Propanol-Prozentbereich von 48-75 % und eluierte darüber hinaus bis zu einer Konzentration von 83 % 1-Propanol.

Dies Ergebnis steht im Gegensatz zu dem bei Sharma *et al.* (1997a) beschriebenen. Dort eluierte das D1-Protein deutlich später und damit bei einem höheren 1-Propanol-Prozentsatz als das D2-Protein.

Bei *Pisum sativum* konnte das D1-Protein in einem ähnlichen Bereich wie bei *Vicia faba* detektiert werden. Es eluierte etwas eher als bei *Vicia faba* und über einen breiteren 1-Propanol-Gradienten von 43-70 %. Auch hier kam es zu keiner ausreichenden Separation des D1-Proteins von dem im PS-II-Proteinkomplex mit ihm eng assoziierten D2-Protein, das im Konzentrationsbereich von 42-70 % 1-Propanol koeluierte und darüber hinaus bis zu einem Prozentsatz von 85 % 1-Propanol von der Säule gewaschen wurde.

Bei der FPLC-Aufreinigung der PS-II-Proteinkomplex-Extrakte von *Lactuca sativa* konnte das D1-Protein ebenfalls bei einem 1-Propanol-Gradienten von 43-67 % eluiert werden. Hier kam es zu einer ganz strikten Koelution des D2-Proteins in demselben Bereich.

Die höchste quantitative Ausbeute von D1-Protein konnte im Vergleich der drei Pflanzenspezies bei *Vicia faba* erzielt werden, da hier eine deutlich höhere Menge an D1-Protein-Monomeren als bei den beiden anderen Pflanzenspezies zu finden war. Zusätzlich zeigten die PS-II-Proteinkomplex-Extrakte von *Vicia faba* auch noch einen starken Nachweis an D1/D2-Dimeren, was den Gehalt an D1-Protein bei dieser Pflanzenspezies insgesamt noch erhöhte. *Lactuca sativa* besaß von allen drei Pflanzenspezies den geringsten Gehalt an D1-

Protein. Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich auch hier *Vicia faba* als die am besten geeignete Pflanzenspezies für die Aufreinigung von D1-Protein heraus.

Im Unterschied zu den bei *Vicia faba* und *Pisum sativum* im Elutionsbereich des D1-Proteins beobachteten Doppelpeaks war bei *Lactuca sativa* jeweils eine Multipeakauftrennung zu finden. Insgesamt zeigte sich bei den drei Spezies nur eine sehr geringe Absorption der Proteine bei allen vier untersuchten Wellenlängen (254, 260, 280 und 360 nm) im Chromatogramm.

3.3.2 Nachweis von nach der Methode von Sharma *et al.* (1997a) aufgereinigtem D1-Protein über SPR-Messungen mit einem Anti-D1-Antikörper-Chip

Zur Kontrolle der Aufreinigung des D1-Proteins wurden die FPLC-Fraktionen parallel auch mit der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Methode auf das Vorhandensein von D1-Protein untersucht. Damit sollte, parallel zu den Untersuchungen über SDS-PAGE und Western-Blotting, eine schnelle Überwachungs-Methode für den Nachweis von D1-Protein in den FPLC-Fraktionen entwickelt werden. Dazu wurde an die Flusszellen eines SPR-Chips, wie in Abschnitt 2.16.3.1 beschrieben, ein polyklonaler Anti-D1-Antikörper immobilisiert. Eine weitere Flußzelle diente als Referenz-Flusszelle.

Es wurden 21 FPLC-Aufreinigungen von PS-II-Proteinkomplexen der drei Pflanzenspezies *Vicia faba*, *Pisum sativum* und *Lactuca sativa* mit verschiedenen Anti-D1-Antikörper-Chips getestet (s. Anhang 7.2). In fünf FPLC-Aufreinigungen konnte D1-Protein über den Anti-D1-Antikörper-Chip mit der SPR-Methode nachgewiesen werden (s. Anhang 7.2).

In der Mehrzahl waren es FPLC-Fraktionen der PS-II-Proteinkomplexe von *Vicia faba*, bei denen mit dem SPR-D1-Antikörper-Assay D1-Proteine nachgewiesen werden konnten. Daneben gelang ein schwacher Nachweis in FPLC-Fraktionen von zwei PS-II-Proteinkomplex-Aufreinigungen von *Pisum sativum*, PS II 12 E1 und PS II 19 E2. Das D1-Protein konnte immer in einem Konzentrationsbereich zwischen 43-60 % 1-Propanol detektiert werden. Die Ergebnisse waren dabei unabhängig von der Konzentrierungsmethode der Fraktionen, da sowohl in Fraktionen, die lyophilisiert worden waren, als auch in Fraktionen, die über die Vakuumzentrifugation getrocknet worden waren, D1-Protein nachgewiesen werden konnte.

Zusätzlich wurden zwei verschiedene RP-Säulenmatrizes getestet, C4 und C18 (s. Abschn. 2.5). Es zeigte sich, dass beide Materialien für die Aufreinigung geeignet sind. Bei der Aufreinigung sowohl mit der stationären C4-Phase als auch mit der C18-Phase konnte in den

FPLC-Fractionen der verschiedenen PS-II-Proteinkomplexe D1-Protein nachgewiesen werden.

Ebenso verhielten sich die Ergebnisse unabhängig von der Konzentrierungsmethode der PS-II-Proteinkomplex-Extrakte, die vor der Aufgabe auf die Säule über verschiedene Methoden konzentriert worden waren (s. Abschn. 2.9 und 2.10). Sowohl bei Aufreinigungen aus mit der Vakuumzentrifugation konzentrierten PS-II-Extrakten als auch bei lyophilisierten PS-II-Extrakten war unabhängig davon D1-Protein nachzuweisen.

Zwei der SPR-Nachweise von D1-Protein von Aufreinigungen aus *Vicia faba* sind im Folgenden exemplarisch dargestellt.

PS-II-Proteinkomplex-Extrakt von *Vicia faba* (48 B) aus Pflanzenanzucht ohne künstliche Zusatzbelichtung:

Abbildung 3.21 zeigt den SPR-Nachweis von D1-Protein in den Fraktionen 21-23 der FPLC-Aufreinigung eines PS-II-Proteinkomplex-Extraktes (PS II 48 B) aus *Vicia faba*-Pflanzen, die ohne künstliche Zusatzbelichtung angezogen worden waren. Hier konnte D1-Protein bei einem 1-Propanol-Prozentsatz von 48-55 % (Fraktionen 21-23) detektiert werden, ein Bereich, in dem auch über SDS-PAGE und Western-Blotting D1-Protein nachgewiesen wurde (s. Abschn. 3.3.1).

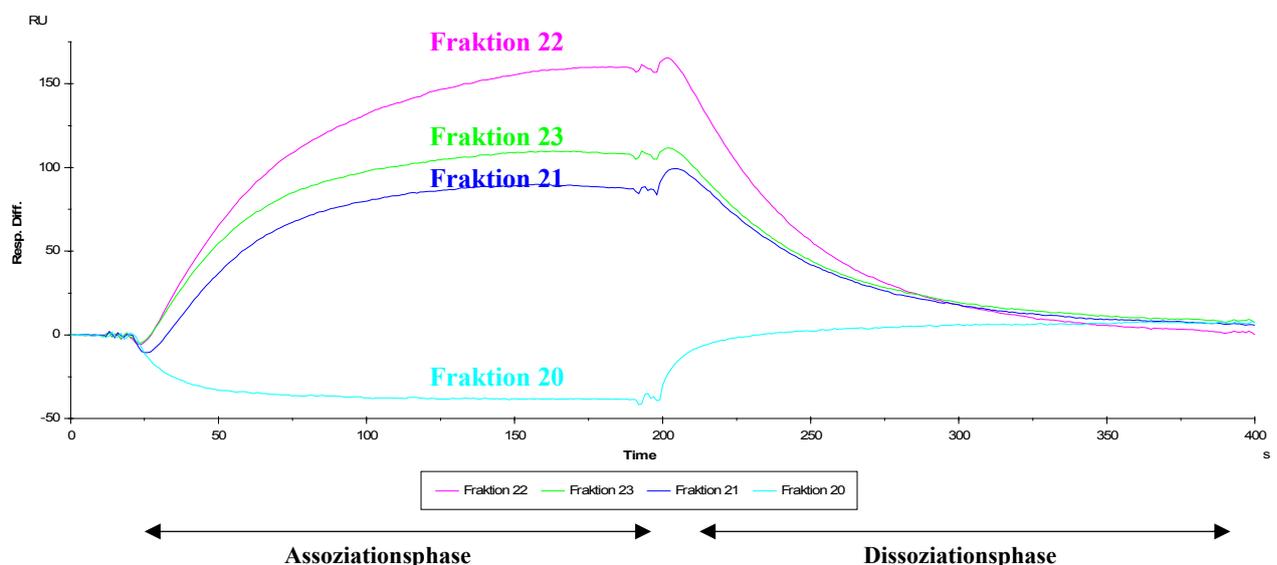


Abb. 3.21: SPR-Messungen mit dem Biacore® 3000. Sensorgramm der FPLC-Fractionen 20-23 des PS-II-Proteinkomplex-Extraktes PS II 48 B (*Vicia faba*) an einem Anti-D1-Antikörper-Chip. “Double referenced”-Kurven. X-Achse: Zeit in Sekunden, y-Achse: SPR-Antwort in Resonance Units (RU). Immobilisierungslevel des Anti-D1-AK auf dem Chip: 13.191 RU.

In Tabelle 3.1 sind die Fraktionen, bei denen ein Bindungsnachweis von D1-Protein erfolgte, mit den entsprechenden Bindungssignalen (in Resonance Units = RU) sowie den daraus resultierenden Änderungen in der Oberflächen-Protein-Konzentration (ng/mm^2) angegeben. In der Fraktion 22 (50-53 % 1-Propanol) konnte die höchste Menge an D1-Protein detektiert werden.

Fraktion	Bindungssignal [RU]	Oberflächen-Protein-Konzentration [ng/mm^2]
21	89	0,089
22	159	0,159
23	109	0,109

Tab. 3.1: Fraktionen des PS-II-Proteinkomplex-Extraktes PS II 48 B von *Vicia faba*, bei denen ein SPR-Bindungsnachweis von D1-Protein über den Anti-D1-Antikörper-Chip erfolgte. Bindungssignal „double referenced“ (RU), Oberflächen-Protein-Konzentration (ng/mm^2).

In den Fraktionen davor und danach (in Abb. 3.21 exemplarisch durch die Fraktion 20 dargestellt) konnte kein Nachweis von D1-Protein über den SPR-D1-Antikörper-Assay erbracht werden. Dort wurden negative Bindungskurven aufgenommen, die auf den Einfluss der lyophilisierten und resuspendierten flüssigen Phase der FPLC-Fraktionen auf den Anti-D1-Antikörper zurückzuführen sind. Der 1-Propanol-Prozentsatz von 48-55 %, bei dem die D1-Proteine mit dem Anti-D1-Antikörper-Chip über die SPR nachgewiesen wurden, ist im FPLC-Chromatogramm dem blau markierten Bereich (s. Abb. 3.22) zuzuordnen.

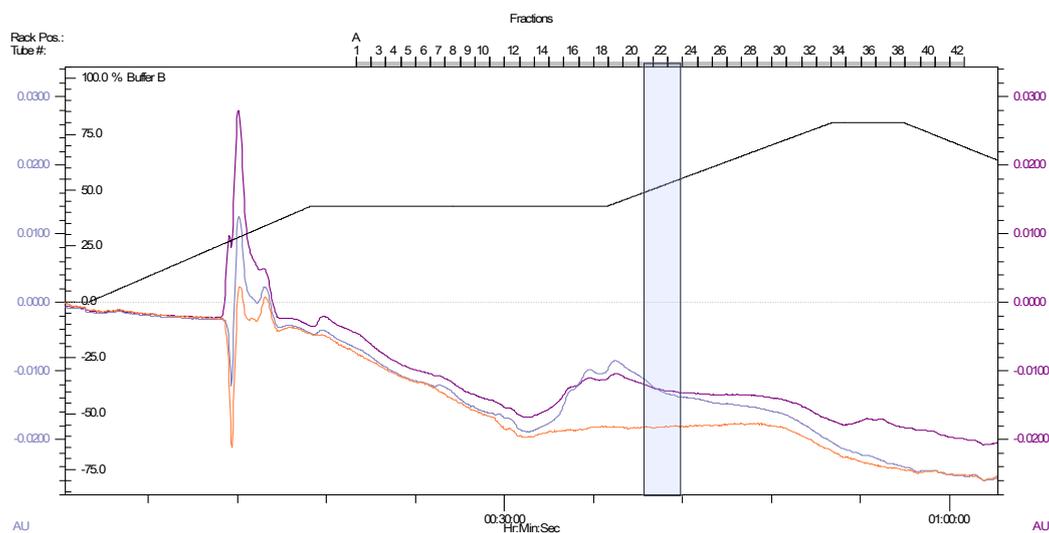


Abb. 3.22: FPLC-Chromatogramm der Auftrennung des PS-II-Proteinkomplex-Extraktes PS II 48 B von *Vicia faba* mit einer RP-C18-Säule (Biorad, München, D); Gradient von 5 % Essigsäure zu 1-Propanol, nach Sharma *et al.* (1997a). Y-Achse rechts: Absorption (AU) bei 254 nm, y-Achse links: Absorption (AU) bei 280 nm, x-Achse unten: Zeit in h:min:s, x-Achse oben: gesammelte Fraktionsnummern, schwarze Linie: Gradient in % 1-Propanol; grüne, lila, blaue, orange Linie: Absorptionsspektren aufgenommen bei 254, 260, 280 und 360 nm.

PS-II-Proteinkomplex-Extrakt von *Vicia faba* (49 BL) aus Pflanzenanzucht mit künstlicher Zusatzbelichtung:

Bei einem PS-II-Proteinkomplex-Extrakt (PS II 49 BL) aus *Vicia faba*-Pflanzen, die mit künstlicher Zusatzbelichtung angezogen worden waren, konnte das D1-Protein bei einem 1-Propanol-Prozentsatz von 43-45 % (Fraktionen 18 und 19) über die SPR-Messmethode mit dem Anti-D1-Antikörper-Chip detektiert werden (s. Abb. 3.23). Über SDS-PAGE und Western-Blotting wurde ebenfalls in diesem Konzentrationsbereich D1-Protein nachgewiesen (s. Abschn. 3.3.1).

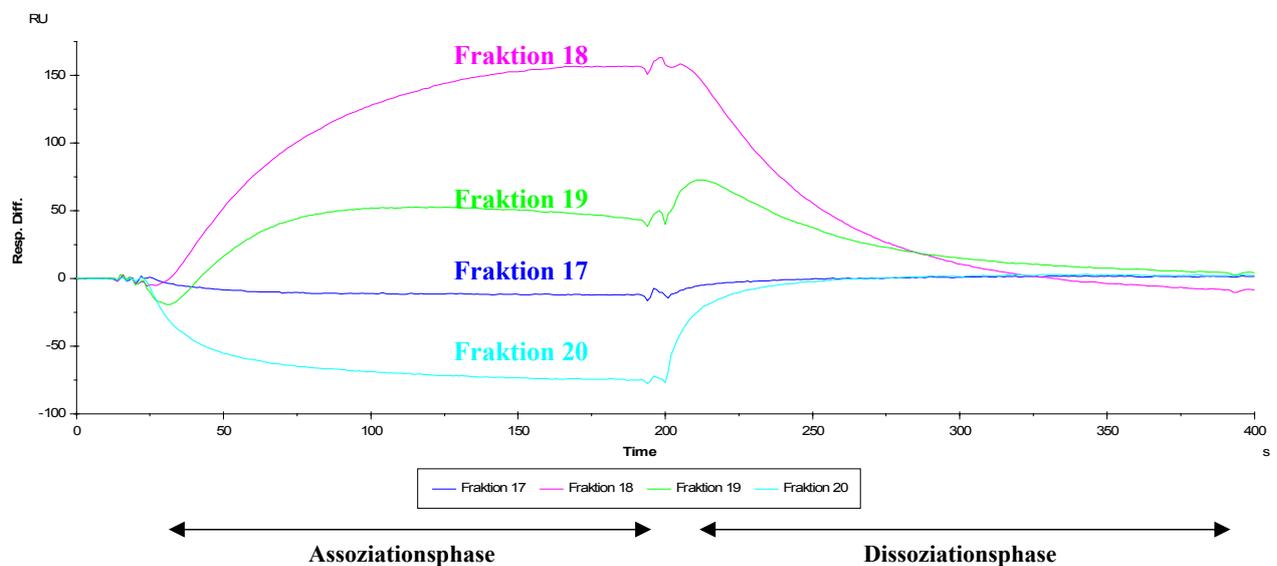


Abb. 3.23: SPR-Messungen mit dem Biacore® 3000. Sensorgramm der FPLC-Fraktionen 17-19 des PS-II-Proteinkomplex-Extraktes PS II 49 BL (*Vicia faba*) an einem Anti-D1-Antikörper-Chip. „Double referenced“-Kurven. X-Achse: Zeit in Sekunden, y-Achse: SPR-Antwort in Resonance Units (RU). Immobilisierungslevel des Anti-D1-AK auf dem Chip: 13.191 RU.

In der Tabelle 3.2 sind die gemessenen Bindungssignale (RU) und die sich daraus ergebenden Oberflächen-Protein-Konzentrationen (ng/mm^2) der Fraktionen 18 und 19 angegeben. Die übrigen Fraktionen (hier exemplarisch Fraktion 17 und 20 dargestellt, s. Abb. 3.23) zeigen eine negative Antwort, was auch hier auf den Einfluss der Rückstände der mobilen Phase, die bei der Lyophilisation nicht entfernt werden konnten, zurückgeführt werden kann.

Fraktion	Bindungssignal [RU]	Oberflächen-Protein-Konzentration [ng/mm^2]
18	156	0,156
19	52	0,052

Tab. 3.2: Fraktionen des PS-II-Proteinkomplex-Extraktes PS II 49 BL von *Vicia faba*, bei denen ein SPR-Bindungsnachweis von D1-Protein über den Anti-D1-Antikörper-Chip erfolgte. Bindungssignal „double referenced“ (RU), Oberflächen-Protein-Konzentration (ng/mm^2).

3.3.3 FPLC-Auftrennung von PS-II-Proteinkomplexen nach der Methode von Piletskaya *et al.* (1997)

Es wurden verschiedene Methoden der FPLC-Aufreinigung getestet, um die für das D1-Protein schonendste Isolationsmethode herauszufinden, so dass das Protein nicht nur aufgereinigt wurde, sondern auch noch funktionell bindefähig vorlag.

Parallel zu der FPLC-Auftrennung der PS-II-Proteinkomplexe nach Sharma *et al.* (1997a) wurde als weitere Reversed-phase-Chromatographie-Aufreinigungsmethode für das D1-Protein die Methode nach Piletskaya *et al.* (1997) getestet. Die bei Piletskaya *et al.* (1997) beschriebene chromatographische Aufreinigung führte dort zu einer sauberen Trennung des D1-Proteins von den anderen Proteinen des PS-II-Proteinkomplexes. Mit der in Abschnitt 2.5.2 beschriebenen FPLC-Aufreinigung des D1-Proteins aus PS-II-Proteinkomplex-Extrakten nach Piletskaya *et al.* (1997) (mit einer stationären C18- wie auch C4-Phase und einem Gradienten der mobilen Phase von 50 mM Tris (pH 8,0) zu 2-Propanol) wurde versucht, das D1-Protein auf einem schonenderen Weg als bei der Methode nach Sharma *et al.* (1997a) zu isolieren. Durch die Durchführung der Aufreinigung bei einem dem physiologischen pH-Wert des D1-Proteins sehr nahe kommenden pH-Wert von 8,0 sollte erreicht werden, dass die Tertiärstruktur des Proteins und damit die Bindungsfähigkeit des Proteins für PS-II-Herbizide besser erhalten bleibt als bei den nach Sharma *et al.* (1997a), bei einem pH-Wert von 3,0, aufgereinigten Proteinen.

Mit der nach der Piletskaya-Methode (Piletskaya *et al.*, 1997) durchgeführten FPLC-Aufreinigung des D1-Proteins war im Gegensatz zur Literatur (Piletskaya *et al.*, 1997) eine Auftrennung der PS-II-Proteinkomplex-Extrakte weder bei *Vicia faba* noch bei *Pisum sativum* oder *Lactuca sativa* zu erzielen. Die PS-II-Proteinkomplexe adsorbierten an die stationäre Phase der Säule und konnten über die mobile Phase nicht wieder von der Säule eluiert werden. Dabei wurden ohne Erfolg diverse Gradienten der mobilen Phase mit und ohne Stufen sowie die zwei stationären Phasen C4 und C18 getestet (s. Abschn. 2.5.2). Um die Aufreinigung genauestens zu überwachen, wurden auch hier die Fraktionen über den gesamten Lauf gesammelt und über SDS-PAGE und Western-Blotting sowie über den Anti-D1-Antikörper-Chip auf den Nachweis von D1-Protein untersucht. Ein Nachweis von D1-Protein war weder über SDS-PAGE noch über Western-Blotting oder über den Anti-D1-Antikörper-Chip in den entsprechend der Methode nach Piletskaya *et al.* (1997) aufgetrennten FPLC-Fraktionen möglich.

3.4 Entwicklung einer SPR-Methode zum qualitativen Nachweis der Bindefähigkeit des aufgereinigten D1-Proteins zu PS-II-Herbiziden

Mit den beschriebenen Methoden der SDS-PAGE, des Western-Blottings und des D1-Protein-Nachweises über die SPR mit einem Anti-D1-Antikörper-Chip konnte zwar der Nachweis des D1-Proteins in den FPLC-Fractionen erbracht, aber keine Aussage über die Funktionalität des aufgereinigten D1-Proteins gemacht werden. Für den Nachweis der erhalten gebliebenen Funktionalität des aufgereinigten D1-Proteins sollte eine Methode entwickelt werden, mit der die Bindefähigkeit des D1-Proteins an PS-II-Herbizide nachgewiesen werden konnte. Dazu wurde die Methode der Oberflächen-Plasmon-Resonanz gewählt, da mit dieser Methode, wie in Abschnitt 2.16 beschrieben, ein direkter Nachweis der Wechselwirkung zwischen dem D1-Protein und seinem Bindepartner möglich ist. Als Ligand wurde als exemplarisches PS-II-Herbizid Simazin ausgewählt. Das Simazin wurde dazu, wie in Abschnitt 2.15 beschrieben, mit einer Hexansäurekette modifiziert, um einen Spacer einzufügen, damit das Simazin für das D1-Protein an der SPR-Chipoberfläche leichter zugänglich und eine Kopplung über den eingefügten Säurerest an die Chipoberfläche eines C1-Chips möglich ist (s. Abschn. 2.15). Um diese Bedingungen erfüllen zu können, wurde die Simazinhexansäure 6-{{4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl}amino}-hexansäure (nachfolgend Simazinderivat oder Simazinhexansäure genannt) synthetisiert.

3.4.1 Synthese des Simazinderivates

Nach der von Goodrow *et al.* (1990) beschriebenen Methode konnten 1,0435 g 6-{{4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl}amino}-hexansäure synthetisiert werden (s. Abschn. 2.15.1 und 2.15.2). Der Nachweis über die korrekte Synthese der 6-{{4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl}amino}-hexansäure konnte sowohl über NMR-Spektroskopie (Nuclear-Magnetic-Resonance-Spektroskopie = Kernmagnetische-Resonanz-Spektroskopie) als auch über Dünnschichtchromatographie (DC) erbracht werden.

Abbildung 3.24 zeigt das NMR-Spektrum der synthetisierten 6-{{4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl}amino}-hexansäure.

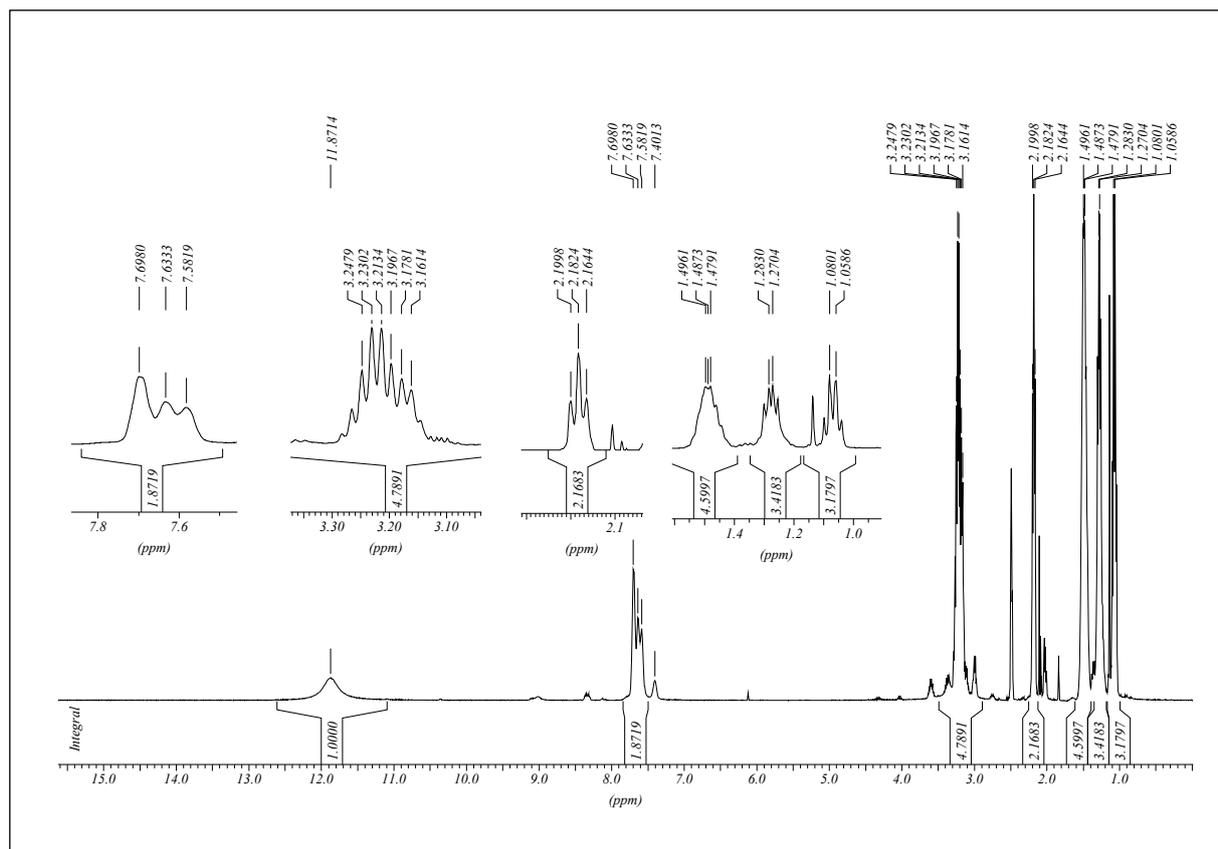


Abb. 3.24: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der synthetisierten 6-[[4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl]amino]-hexansäure. X-Achse: chemische Verschiebung δ (ppm).

Es konnten folgende Werte über das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ($\text{DMSO-}d_6$) bestimmt werden: δ 11,87 (br, 1 H, CO_2H), δ 7,6 (br, 2 H, 2 NH), δ 3,2 (m, 4 H, 2 CH_2N), δ 2,18 (t, $J = 6,6$ Hz, 2 H, CH_2CO_2), δ 1,48 (br, 4 H, CH_2CH_2), δ 1,28 (m, 2 H, CH_2), δ 1,07 (m, 3 H, CH_3). Die gemessenen Werte standen damit in guter Übereinstimmung zur Literatur (Goodrow *et al.*, 1990).

Über die Dünnschichtchromatographie konnte analog zu der Beschreibung bei Goodrow *et al.* (1990) die Bildung des Zwischenproduktes 4,6-Dichloro-N-ethyl-1,3,5-triazin-2-amin nach dem ersten Syntheseschritt nachgewiesen werden. Abbildung 3.25 zeigt das UV-Bild der Dünnschichtchromatographie des 4,6-Dichloro-N-ethyl-1,3,5-triazin-2-amins. Der bestimmte R_f -Wert des 4,6-Dichloro-N-ethyl-1,3,5-triazin-2-amins von 0,72 entsprach dem in der Literatur (Goodrow *et al.*, 1990) angegebenen Wert. Ebenso konnte im zweiten Syntheseschritt nach 9 h Kochen bei 63°C in Ethanol der Nachweis des Verschwindens des 4,6-Dichloro-N-ethyl-1,3,5-triazin-2-amins über die Dünnschichtchromatographie erbracht werden (s. Abb. 3.26). Abbildung 3.26 zeigt, dass das Zwischenprodukt des ersten Syntheseschrittes nicht mehr nachweisbar ist.

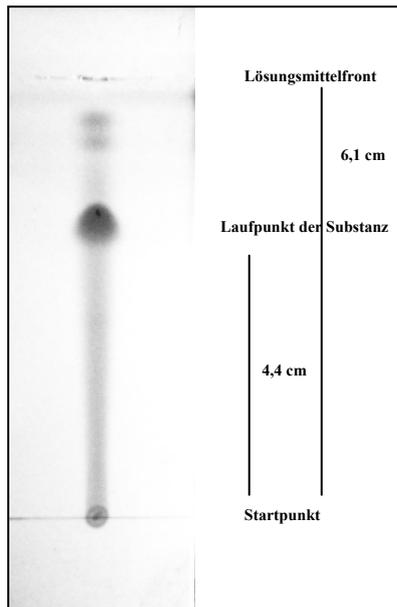


Abb. 3.25: UV-Bild der Dünnschichtchromatographie des Zwischenproduktes (4,6-Dichloro-N-ethyl-1,3,5-triazin-2-amin) des ersten Syntheseschrittes.

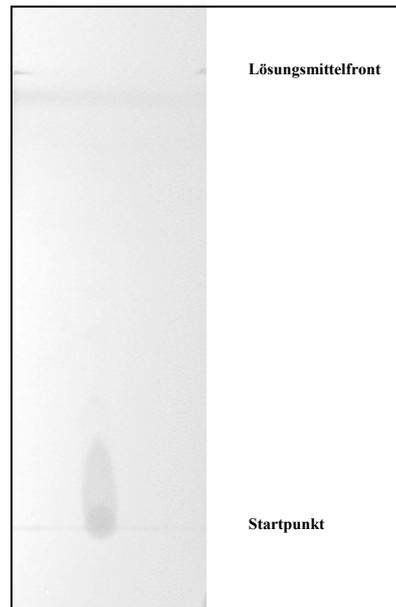


Abb. 3.26: UV-Bild der Dünnschichtchromatographie des Zwischenproduktes im zweiten Syntheseschritt nach 9 h Kochen bei 63 °C.

3.4.2 Kopplung des Simazinderivates an einen C1-Chip – Nachweis der Immobilisierung über einen Anti-Triazin-Antikörper

Das synthetisierte Simazinderivat wurde über die in Abschnitt 2.16.4.1 beschriebene Methode der Thiolkopplung kovalent an einen Biacore-C1-Chip gekoppelt. Abbildung 3.27 zeigt das Sensorgramm einer exemplarischen Thiolkopplung des Simazinderivates mit den verschiedenen Immobilisierungsschritten.

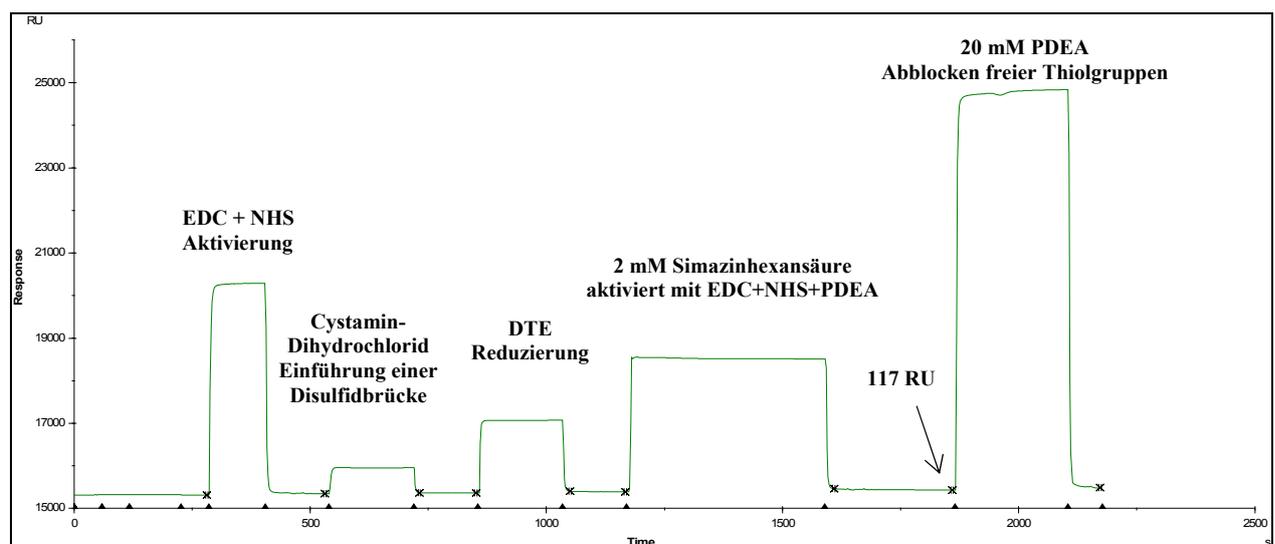


Abb. 3.27: Sensorgramm der Oberflächen-Thiolkopplung der Simazinhexansäure an einen C1-Chip. X-Achse: Zeit in s, y-Achse: Antwort in Resonance Units (RU).

Zur Aktivierung (s. Abschn. 2.16.4.1) musste die Simazinhexansäure mit einem Überschuss an PDEA versetzt werden. Diese Substanz reagiert ebenfalls mit freien Thiolgruppen der Oberfläche und wird deshalb üblicherweise über Filtration vor der Immobilisierung abgetrennt. Aufgrund der geringen Größe des Simazinderivates (403 g/mol) war eine einfache Reinigung im vorliegenden Fall nicht möglich, so dass nur ein undefinierter Anteil der freien Oberflächengruppen auf dem Chip mit dem Simazinderivat belegt werden konnte. Aus diesem Grund sollte die Menge des immobilisierten Simazinderivates über die Wechselwirkung mit einem Anti-Triazin-Antikörper quantitativ bestimmt werden (s. Abschn. 2.16.4.2).

Nach folgender Formel kann die Bindungskapazität der modifizierten Oberfläche aus dem Sensorgramm der Immobilisierung berechnet werden (Stenberg *et al.*, 1991).

$$R_{\max} = R * MW_{\text{Analyt}} / MW_{\text{Ligand}} * S_{\text{AL}}$$

R_{\max} = maximale Bindungskapazität an Analyten

R – im Sensorgramm gebundene Menge an Analyt = 117,4 RU

MW_{Analyt} – Molekülmasse des Analyten (Anti-Triazin-AK) = 150.000 g/mol

MW_{Ligand} – Molekülmasse des Liganden (Simazinderivat) = 403 g/mol

S_{AL} – stöchiometrischer Faktor der Wechselwirkung zwischen Ligand und Analyt = 1

Formel 3.1: Formel zur Berechnung der maximalen Bindungskapazität an Analyten.

Nach Berechnung ergibt sich für die hier exemplarisch aufgeführte Thiolkopplung mit einem Signal von 117 RU (s. Abb. 3.27) nach der Ankopplung der Simazinhexansäure (Molekulargewicht 403 g/mol) eine theoretische maximale Bindungskapazität (R_{\max}) von 43.697 RU für den Analyten Anti-Triazin-AK (Molekulargewicht 150.000 g/mol).

3.4.3 Auswertung der Affinität und der Kinetik der Anti-Triazin-Antikörper-Bindung an den Simazinderivat-Chip

Über die Auswertung der Simazinderivat-Anti-Triazin-AK-Bindung sollte herausgefunden werden, wie hoch die tatsächliche maximale Bindungskapazität (R_{\max}) der Chipoberfläche war, um darüber einen Rückschluss auf die ungefähre immobilisierte Menge an Simazinderivat auf der Chipoberfläche ziehen zu können. Um die Bindungen des Anti-Triazin-AK an die Simazinderivat-Oberfläche sowohl über die Affinität als auch über die Kinetik auswerten zu können, wurden sechs verschiedene Konzentrationen des Antikörpers von 26-867 nM sowie PBS-Puffer als Kontrollwerte gemessen (s. Abschn. 2.16.4.2). Zuvor wurde die optimale Flussrate für kinetische Messungen, bei der kein Massetransfer auftritt, bestimmt und mit 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ ausgewählt.

3.4.3.1 Affinitätsauswertung der Anti-Triazin-Antikörper-Bindung an den Simazinderivat-Chip

Über eine Affinitätsauswertung der gemessenen Resonanzwerte aller sechs Antikörper-Konzentrationen im Gleichgewicht, aufgetragen gegen die Konzentrationen (s. Abb. 3.28), konnten die Gleichgewichtskonstanten der Assoziation (K_A) und Dissoziation (K_D) über die BIAevaluation Software bestimmt werden (s. Abschn. 2.16.2.5). Die Dissoziations-Gleichgewichtskonstante wurde mit $2,76 \cdot 10^{-7}$ M bestimmt (s. Tab. 3.3). Die maximale Bindungskapazität (R_{\max}) wurde auf 61,3 RU berechnet und lag damit um den Faktor 700 unter dem theoretisch berechneten Wert (s. Abschn. 3.4.2).

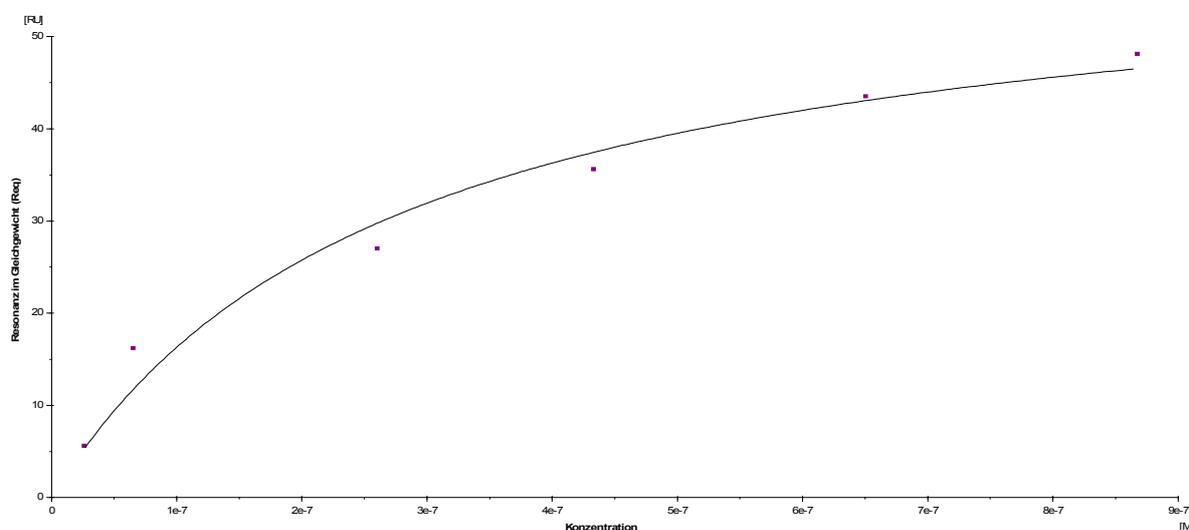


Abb. 3.28: Affinität der Anti-Triazin-AK-Bindung an das Simazinderivat im Gleichgewicht. X-Achse: Konzentration in [M], y-Achse: Resonanzsignal im Gleichgewicht (Req) in [RU].

K_A (1/M)	SE (K_A)	K_D (M)	R_{\max}	SE (R_{\max})	Chi ²
$3,62 \cdot 10^6$	$1,09 \cdot 10^6$	$2,76 \cdot 10^{-7}$	61,3	6,7	8,54

Tab. 3.3: Daten der Affinitätsauswertung der Anti-Triazin-AK-Bindung am Simazinderivat-Chip. K_A = Assoziations-Gleichgewichtskonstante, K_D = Dissoziations-Gleichgewichtskonstante, R_{\max} = Maximale Bindungskapazität des Chips, SE = Standard-Fehler, Chi² = Fläche zwischen berechnetem („gefittetem“) und gemessenem Sensorgramm.

3.4.3.2 Kinetische Auswertung der Anti-Triazin-Antikörper-Bindung an den Simazinderivat-Chip

Zusätzlich konnte mit den erhaltenen Daten auch eine kinetische Auswertung in der BIAevaluation Software durchgeführt werden, so dass sich auch darüber die maximal mögliche Bindungskapazität der Chipoberfläche (R_{\max}) sowie weitere Werte (wie z. B. die Ratenkonstanten k_a und k_d) bestimmen ließen (s. Abschn. 2.16.2.5).

Es wurde eine e-Kurvenanpassung über das 1:1-Langmuir-Modell mit driftender Basislinie durchgeführt (s. Abb. 3.29, schwarze Linien) (s. Abschn. 2.16.2.5). Die dabei bestimmten Konstanten k_a , k_d , K_A , K_D , R_{\max} sowie weitere Parameter sind in Tabelle 3.4 angegeben.

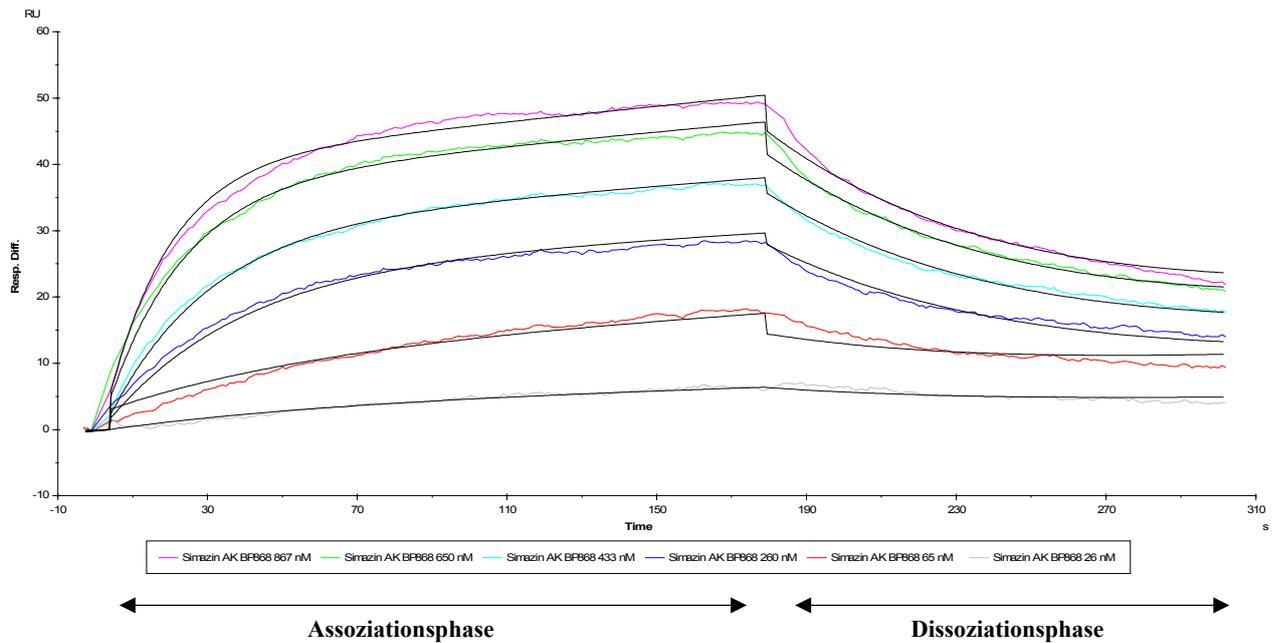


Abb. 3.29: Kinetische Auswertung der Anti-Triazin-AK-Bindung an das Simazinderivat. Sensorgramm der sechs Anti-Triazin-AK-Konzentrationen: 867 nM, 650 nM, 433nM, 260 nM, 65 nM und 26 nM. X-Achse: Zeit in (s), y-Achse: SPR-Antwort in (RU). e-Kurvenanpassung über das 1:1-Langmuir-Modell mit driftender Basislinie (schwarze Linien).

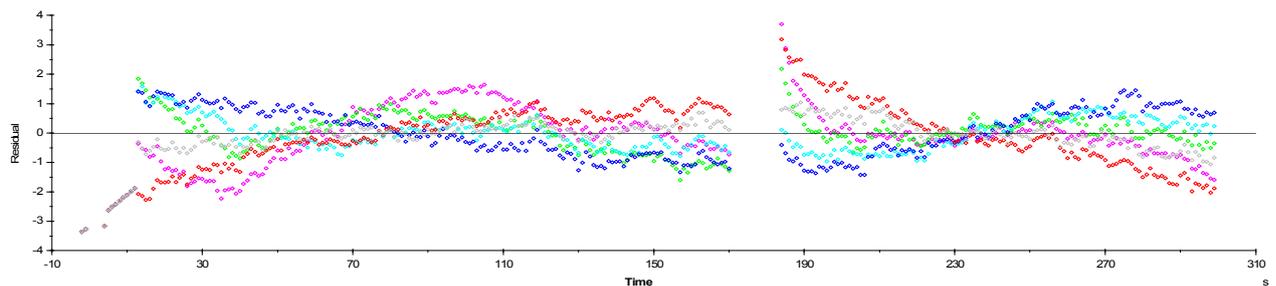


Abb. 3.30: „Residuals“ der e-Kurvenanpassung über das 1:1-Langmuir-Modell mit driftender Basislinie. X-Achse: Zeit in (s), y-Achse: „Residuals“.

	K_a (1/Ms)	SE (k_a)	k_d (1/s)	SE (k_d)	K_A (1/M)	K_D (M)	R_{max} (RU)	SE (R_{max})	Chi ²
1:1-Langmuir-Modell mit driftender Basislinie	$5,4 \cdot 10^4$	640	0,0139	$2,51 \cdot 10^{-4}$	$3,88 \cdot 10^6$	$2,58 \cdot 10^{-7}$	45,4	0,276	0,559

	Req(RU)	kobs (1/s)	RI (RU)	SE (RI)	Drift (RU/s)	SE (Drift)
Simazin AK BP868 867 nM	35	0,0607	5,24	0,164	0,0581	$8,71 \cdot 10^{-4}$
Simazin AK BP868 650 nM	32,5	0,049	4,7	0,15	0,0523	$8,59 \cdot 10^{-4}$
Simazin AK BP868 433 nM	28,5	0,0373	2,17	0,134	0,0421	$8,24 \cdot 10^{-4}$
Simazin AK BP868 260 nM	22,8	0,0279	1,64	0,118	0,0307	$7,39 \cdot 10^{-4}$
Simazin AK BP868 65 nM	9,15	0,0174	3,07	0,0771	0,0328	$4,21 \cdot 10^{-4}$
Simazin AK BP868 26 nM	4,16	0,0153	0,0263	0,0672	0,0141	$3,18 \cdot 10^{-4}$

Tab. 3.4: Tabelle mit kinetischen Daten der e-Kurvenanpassung über das 1:1-Langmuir-Modell mit driftender Basislinie. K_a = Assoziations-Ratenkonstante, k_d = Dissoziations-Ratenkonstante, K_A = Assoziations-Gleichgewichtskonstante, K_D = Dissoziations-Gleichgewichtskonstante, R_{max} = Maximale Bindungskapazität des Chips, RI= Refraktiver Index-Effekt durch den Puffer, Req = Antwort im Gleichgewicht (50 % R_{max}), kobs = beobachtete k_a ($= k_a \cdot C + k_d$), Konz = Konzentration, SE = Standard-Fehler, Chi² = Fläche zwischen berechnetem (angepasstem) und gemessenem Sensorgramm.

Hierbei konnte eine Dissoziations-Gleichgewichtskonstante (K_D) von $2,58 \cdot 10^{-7}$ M bestimmt werden, die sehr gut mit dem Wert aus der Affinitätsberechnung ($2,76 \cdot 10^{-7}$ M) übereinstimmte (s. Tab. 3.3 und 3.4). Zusätzlich konnten die Ratenkonstanten berechnet werden; sie lagen für k_a bei $5,4 \cdot 10^4 \text{ Ms}^{-1}$ und für k_d bei $0,0139 \text{ s}^{-1}$ (s. Tab. 3.4).

χ^2 gibt die Fläche zwischen dem gemessenen Sensorgramm und der über die Anpassung berechneten Kurve wieder. Mit einem χ^2 von 0,559 lagen die realen Werte sehr nahe bei den über die Kurvenanpassung nach dem 1:1-Langmuir-Modell angepassten Werten (s. Tab. 3.4). Die relativ gute Übereinstimmung der realen Werte mit der Kurvenanpassung konnte auch anhand der „Residuals“ nachgewiesen werden, die die Unterschiede zwischen den experimentellen und den in der Kurvenanpassung (nach 1:1-Langmuir-Modell) berechneten Werten visualisieren (s. Abb. 3.30). Wie gefordert (Biacore® 2000/3000 Working with Small Molecules, 2003), schwankten die Werte nur in einem Bereich von ca. 4 RU und stellten sich relativ vermischt dar.

Über die kinetische Auswertung der Anti-Triazin-AK-Bindung an das Simazinderivat konnte eine maximale Bindungskapazität (R_{\max}) von 45,4 RU berechnet werden (s. Tab. 3.4), was um den Faktor 1.000 unter dem theoretisch berechneten Wert für R_{\max} lag. Somit konnte für die spätere maximale Bindungskapazität von D1-Protein auch nur mit einer sehr viel geringeren Bindung an den Simazinderivat-Chip gerechnet werden. Da die Bindung des Anti-Triazin-AK an das Simazinderivat jedoch von anderen Faktoren (wie die Bindung des D1-Proteins) abhängig ist, kann diese geringere Bindungshöhe des Antikörpers nicht mit der des D1-Proteins gleichgesetzt werden. Das D1-Protein könnte aufgrund seines anderen Bindungsmechanismus an das Simazinderivat auch eine höhere Bindungsaffinität besitzen als der Anti-Triazin-AK, der über sein Paratop an die Simazinhexansäure bindet.

3.4.4 Überprüfung der Bindungseigenschaften des Simazinderivates zur Q_B -Bindenische mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor

Über die Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes (PET) durch Bindung an die Q_B -Bindenische des Photosystems II der Chloroplasten-Thylakoide sollte im Vergleich zu dem unmodifizierten Simazin untersucht werden, inwieweit die Bindungsfähigkeit des Simazins zur Q_B -Bindenische durch die Modifikation mit der Hexansäurekette beeinträchtigt wird. Die Messungen, beschrieben in Abschnitt 2.7.2, wurden mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor durchgeführt. Abbildung 3.31 zeigt die Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes durch Simazin, das Simazinderivat, Diuron, Atrazin, Metribuzin und Irgarol im Vergleich.

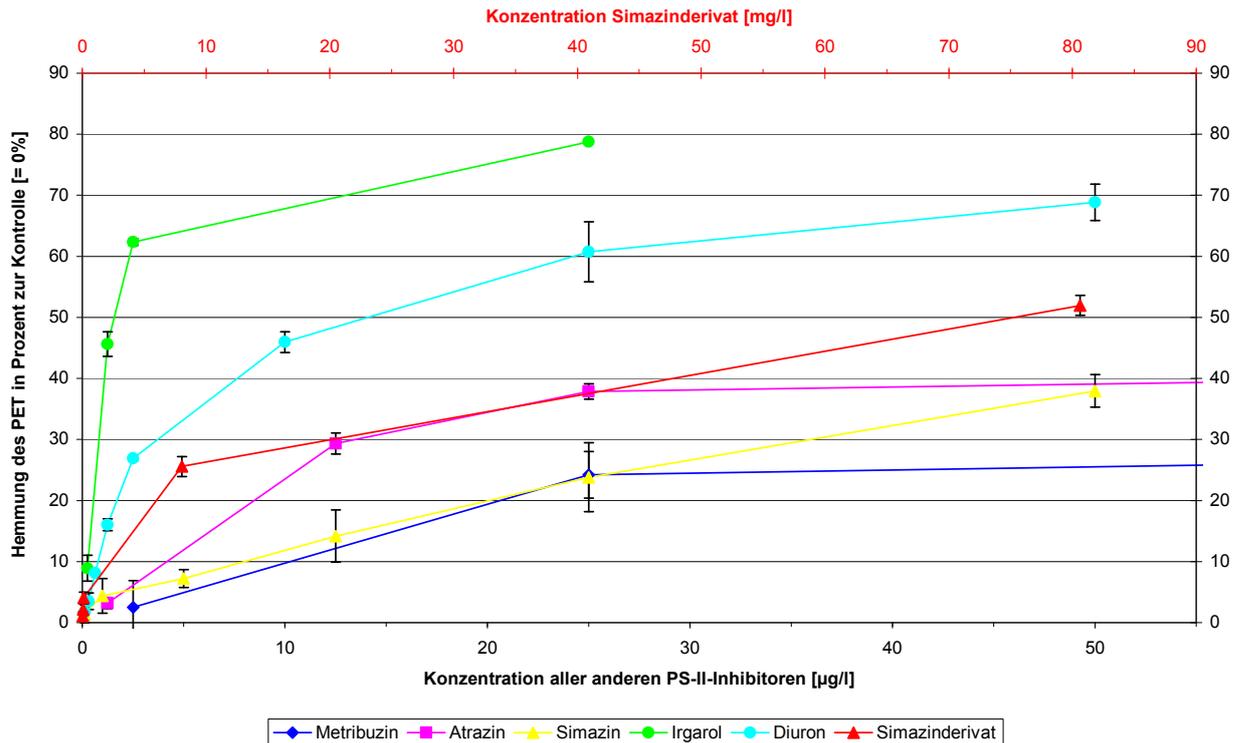


Abb. 3.31: Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes (PET) (%) durch Simazin, Atrazin, Metribuzin, Diuron, Irgarol und Simazinhexansäure. Y-Achse: Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes in Prozent zur Kontrolle (= 0%), x-Achse oben: Konzentration des Simazinderivates (mg/l), x-Achse unten: Konzentration aller anderen PS-II-Inhibitoren ($\mu\text{g/l}$), Fehlerindikator: \pm Standardabweichung, Anzahl der Messwiederholungen = 4.

Als Ergebnis dieser Experimente war festzuhalten, dass die synthetisierte Simazinhexansäure den photosynthetischen Elektronentransport im Konzentrationsbereich von mg/l signifikant hemmte. Dabei war die Bindungsaffinität im Vergleich zum freien Simazin deutlich niedriger. Es zeigte sich eine um den Faktor 300 geringere Hemmung des PET durch das Simazinderivat.

Parallel verglichen wurde die Hemmung des PET durch die PS-II-Herbizide Diuron, Atrazin, Metribuzin, Simazin sowie durch das derzeit als „Antifoulingmittel“ angewendete Irgarol (s. Abb. 3.31 und Anhang 7.3). Die höchste Hemmwirkung auf den PET innerhalb der Herbizide zeigte, übereinstimmend mit der Literatur (Schnabl *et al.*, 2000; Trapmann, 1999; Schnabl und Trapmann, 2001), Diuron, gefolgt von Atrazin, Simazin und Metribuzin. Das „Antifoulingmittel“ Irgarol, das in Schiffslacken verwendet wird, wies noch eine signifikant höhere Hemmung des PET auf als Diuron (s. Abb. 3.31 und Anhang 7.3).

3.4.5 Qualitativer Nachweis der Bindefähigkeit von aufgereinigtem D1-Protein zu einem PS-II-Herbizid über einen Simazinderivat-Chip mittels SPR

Mit der hier entwickelten Methode (s. Abschn. 2.16.4 und 3.4.2) sollte ein qualitativer Nachweis der Bindefähigkeit von aufgereinigtem D1-Protein erbracht und damit die erhalten gebliebene Bindefähigkeit des isolierten D1-Proteins zu PS-II-Herbiziden nachgewiesen werden.

Auch in diesem Fall wurden D1-Protein-Aufreinigungen der drei Pflanzenspezies *Vicia faba*, *Pisum sativum* und *Lactuca sativa* getestet. Aufgrund der in Abschnitt 3.3.3 genannten Gründe wurden nur D1-Protein-Aufreinigungen, die nach der Methode von Sharma *et al.* (1997a) isoliert worden waren, untersucht. In 75 % der getesteten FPLC-Aufreinigungen konnte bei allen untersuchten Spezies bindefähiges D1-Protein über die Bindung an das Simazinderivat mittels der Methode der SPR nachgewiesen werden. Die Durchführung der Messungen ist in Abschnitt 2.16.4.3 beschrieben.

3.4.5.1 D1-Protein-Aufreinigung von *Vicia faba*

Bei der FPLC-Aufreinigung des PS-II-Proteinkomplex-Extraktes PS II 53 BL von *Vicia faba* konnte, wie in Abbildung 3.32 dargestellt, bindefähiges D1-Protein in den Fraktionen 28-37 und damit in einem Konzentrationsbereich von 42-58 % 1-Propanol nachgewiesen werden. Dies entspricht einem ähnlichen Bereich, in dem das D1-Protein über SDS-PAGE, Western-Blotting und Anti-D1-AK-Chip detektiert werden konnte (s. Abschn. 3.3.1.1 und 3.3.2). Die Fraktionen wurden über drei mit Simazinderivat modifizierte Flusszellen (FC 2-4) sowie eine bis auf das Simazinderivat vollkommen gleich behandelte Referenz-Flusszelle (FC 1) geleitet (s. Abschn. 2.16.4.1, 2.16.4.3 und 3.4.2).

In der Tabelle 3.5 sind die gemessenen Signale der Fraktionen auf Flusszelle 3 (FC 3-1 „double referenced“), die eine Bindung von D1-Protein an das Simazinderivat zeigten, angegeben.

Fraktion	Bindungssignal (RU)	Fraktion	Bindungssignal (RU)
28	4,5	33	7
29	11	34	5,5
30	17	35	7
31	11	37	4,5
32	3		

Tab. 3.5: FPLC-Fraktionen des PS-II-Proteinkomplex-Extraktes PS II 53 BL von *Vicia faba*, bei denen ein SPR-Bindungsnachweis von D1-Protein über den Simazinderivat-Chip erfolgte. Bindungssignal „double referenced“ (RU). FC 3-1.

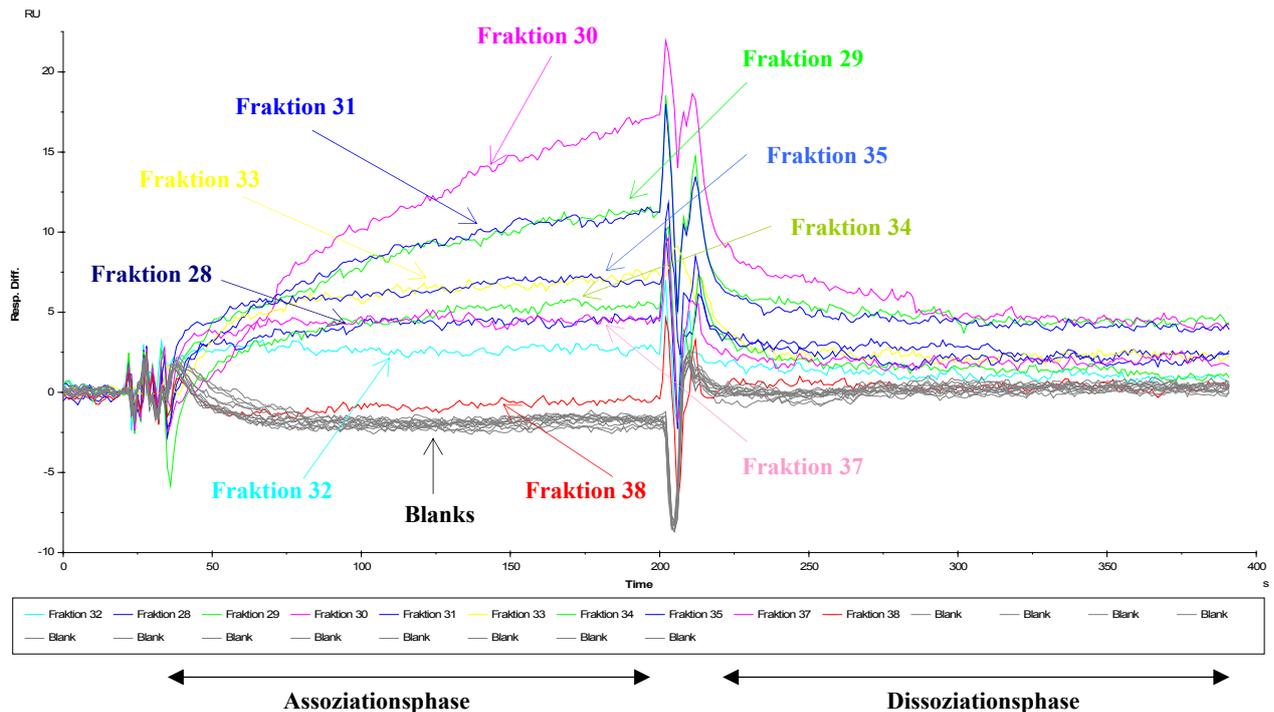


Abb. 3.32: Sensorgramm der FPLC-Fraktionen 28-38 des PS-II-Proteinkomplex-Extraktes PS II 53 BL von *Vicia faba* an einem Simazinderivat-Chip. "Double referenced"-Kurven gegen einen Realblank aus einem FPLC-Blanklauf (s. Abschn. 2.16.4.3). X-Achse: Zeit in (s), y-Achse: SPR-Antwort in (RU), schwarze Kurven: HBS-EP-Blanks. FC 3-1.

In der Fraktion 28 war ein erster Nachweis von bindefähigem D1-Protein von ca. 4,5 RU auf der mit Simazinderivat modifizierten Flusszelle 3 zu detektieren. In der FPLC-Fraktion 30 konnte der höchste Bindungsnachweis mit ca. 17 RU erbracht werden (s. Tab. 3.5 und Abb. 3.32). Ab der Fraktion 38 war kein D1-Protein über den Simazinderivat-Chip mehr nachzuweisen. Fraktion 38 zeigte keinen wesentlichen Unterschied zu den HBS-EP-Blanks (s. Abb. 3.32). Ebenso war in den Fraktionen 1-27 und 36 kein Bindungsnachweis festzustellen. Die Fraktionen, in denen kein Bindungsnachweis erbracht werden konnte, zeigten eine Schwankung der Messwerte von ca. ± 2 RU. Die zusätzlich durchgeführten HBS-EP-Blank-Injektionen, in der Abbildung 3.32 schwarz dargestellt, wiesen reproduzierbar ein negatives Signal von ca. -2 RU auf.

Auf der ebenfalls mit Simazinderivat belegten Flußzelle 4 (FC 4-1 „double referenced“) war nur noch eine Bindung von ca. 7 RU bei der Fraktion 30, von ca. 5 RU bei der Fraktion 31 und von ca. 4 RU bei der Fraktion 29 nachzuweisen (s. Abb. 3.33). Auch hier kam es bei allen anderen getesteten Fraktionen, in Abbildung 3.33 exemplarisch durch Fraktion 28 und 32 dargestellt, zu einer Schwankung der Messwerte von ca. ± 2 RU, während die HBS-EP-Blank-Injektionen ein negatives Sensorgramm von ca. -2,5 RU aufwiesen. Der sehr viel geringere Bindungsnachweis auf dieser Flusszelle kann zum einen auf eine zu geringe Menge an D1-Protein zurückzuführen sein, da auf Flusszelle 3 schon das in der Fraktion vorhandene D1-Protein abgefangen wurde. Zum anderen kann auch hier ein zu geringes

Immobilisierungslevel der Simazinhexansäure aus den in Abschnitt 3.4.2 genannten Gründen für die geringe Bindungskapazität verantwortlich sein.

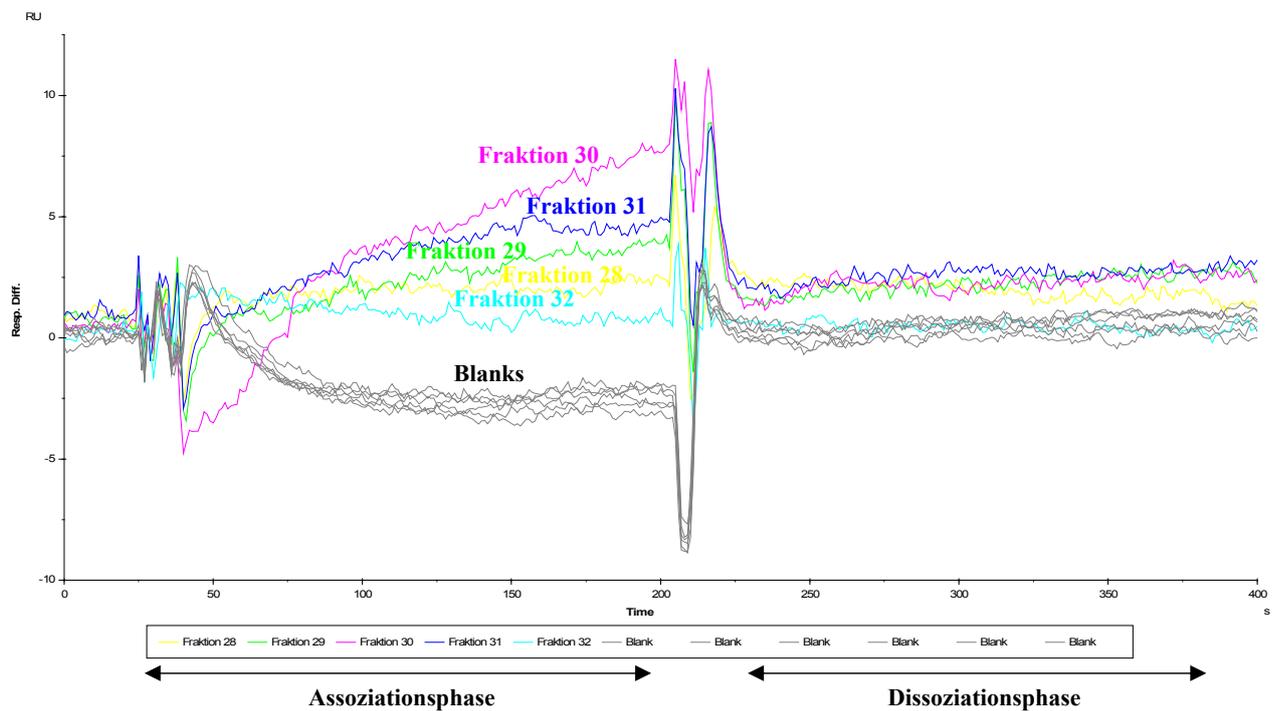


Abb. 3.33: Sensorgramm der FPLC-Fraktionen 28-32 des PS-II-Extraktes PS II 53 BL von *Vicia faba* an einem Simazinderivat-Chip. “Double referenced”-Kurven gegen einen Realblank aus einem FPLC-Blanklauf. X-Achse: Zeit in (s), y-Achse: SPR-Antwort in (RU), schwarze Kurven: HBS-EP-Blanks. FC 4-1.

Der Bereich von 42-58 % 1-Propanol, in dem bindefähiges D1-Protein nachgewiesen wurde, konnte im FPLC-Chromatogramm (s. Abb. 3.34) wie bei den Nachweisen über SDS-PAGE, Western-Blotting und Anti-D1-Antikörper-Chip dem Doppelpack bei ca. 30 min (s. Abb. 3.34, blau markierter Bereich) zugeordnet werden.

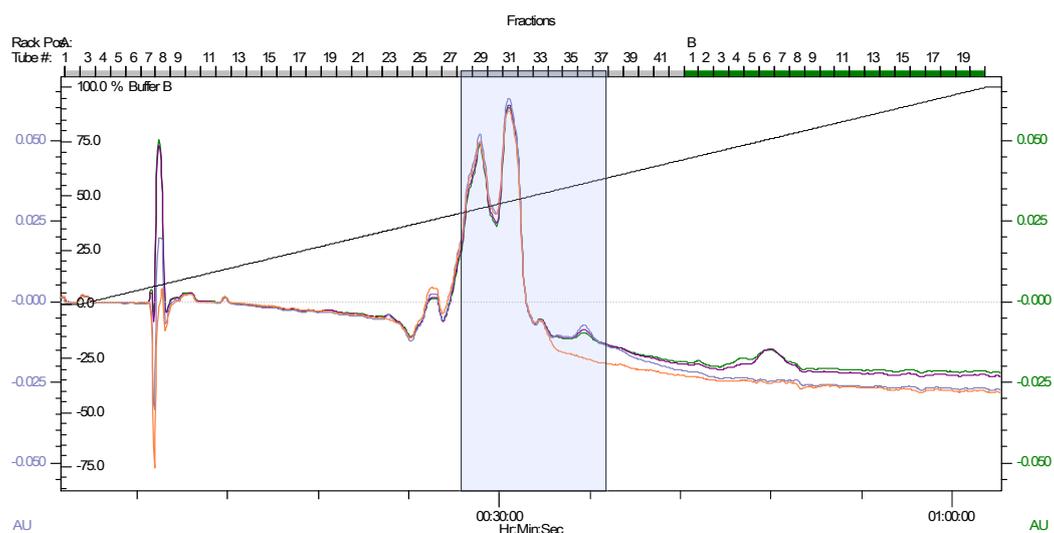


Abb. 3.34: FPLC-Chromatogramm der Auftrennung des PS-II-Proteinkomplex-Extraktes PS II 53 BL von *Vicia faba* mit einer RP-C18-Säule (Grace Vydac, Hesperia, USA); Gradient von 5 % Essigsäure zu 1-Propanol, nach Sharma *et al.* (1997a). Y-Achse rechts: Absorption (AU) bei 280 nm, x-Achse unten: Zeit in h:min:s, x-Achse oben: gesammelte Fraktionsnummern, schwarze Linie: Gradient in % 1-Propanol; grüne, lila, blaue, orange Linie: Absorptionsspektren aufgenommen bei 254, 260, 280 und 360 nm.

Dagegen war auf der ebenfalls mit Simazinderivat immobilisierten Flusszelle 2 keine Bindung von D1-Protein nachzuweisen. Dies spricht dafür, dass auf dieser Flusszelle zu wenig Simazinderivat immobilisiert werden konnte und die SPR-Antwort nach der Immobilisierung hauptsächlich auf gekoppeltes PDEA, das nicht aus der Ligandenlösung abgetrennt werden konnte (s. Abschn. 3.4.2), zurückzuführen ist.

3.4.5.2 D1-Protein-Aufreinigung von *Lactuca sativa*

Bei der FPLC-Aufreinigung des PS-II-Proteinkomplex-Extraktes von *Lactuca sativa* PS II 54 KL konnte bindefähiges D1-Protein in einem Konzentrationsbereich von 48-50 % (Fraktion 32) und 55-57 % (Fraktion 36) 1-Propanol mit dem Simazinderivat-Chip detektiert werden (s. Abb. 3.35).

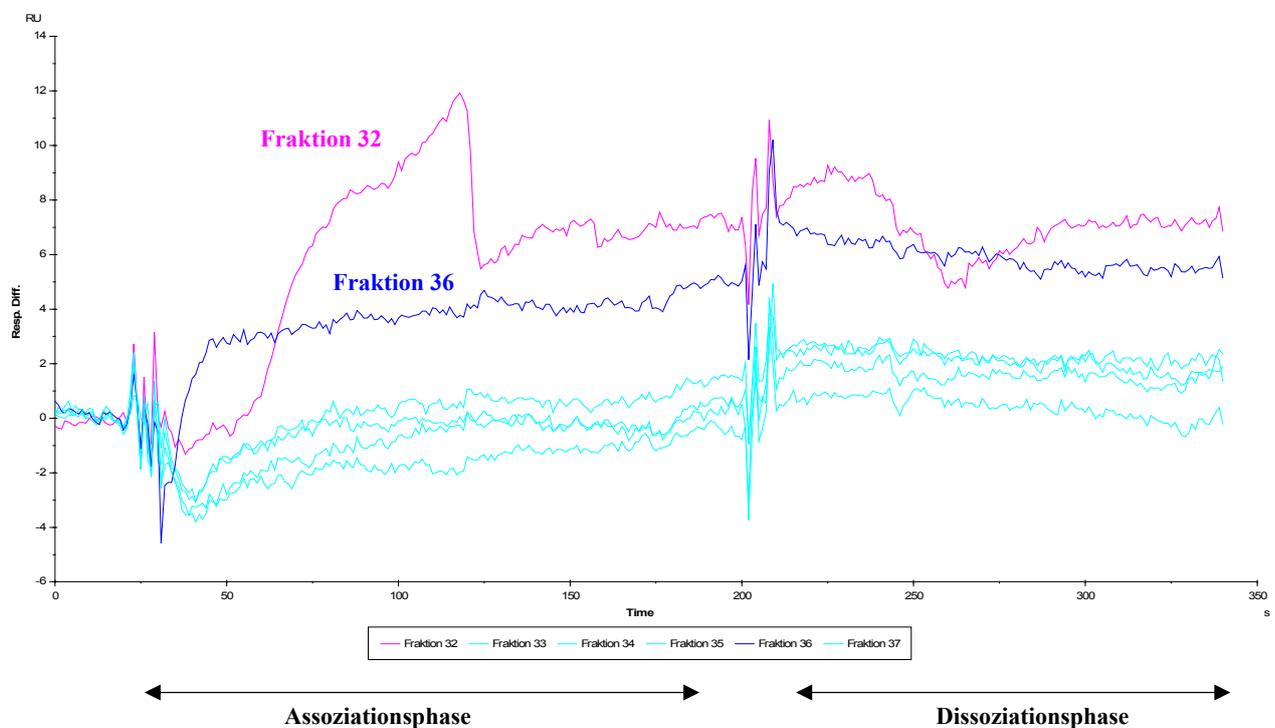


Abb. 3.35: Sensorgramm der FPLC-Fraktionen 32-37 des PS-II-Proteinkomplex-Extraktes PS II 54 KL von *Lactuca sativa* an einem Simazinderivat-Chip. "Double referenced"-Kurven gegen einen HBS-EP-Blank. X-Achse: Zeit in Sekunden, y-Achse: SPR-Antwort in Resonance Units (RU). Türkisfarbige Kurven: Fraktionen 33-35 und 37.

Dies entsprach dem Bereich, in dem auch über SDS-PAGE und Western-Blotting D1-Protein nachgewiesen werden konnte (s. Abschn. 3.3.1.3). Abbildung 3.35 zeigt den Bindungsnachweis in Höhe von ca. 12 RU bei der Fraktion 32 und von ca. 5 RU bei der Fraktion 36. Dagegen kam es in den anderen getesteten Fraktionen 1-31, 33-35 und 37-62 nur zu Schwankungen im Bereich von ca. +/-2 RU, die in der Abbildung 3.35 exemplarisch durch die Fraktionen 33-35 und 37 vertreten sind.

3.4.5.3 D1-Protein-Aufreinigung von *Pisum sativum*

Auch in der FPLC-Aufreinigung des PS-II-Proteinkomplex-Extraktes PS II 55 E1 von *Pisum sativum* konnte der Nachweis von Herbizid-bindefähigem D1-Protein über die Bindung an den Simazinderivat-Chip erbracht werden. Hier konnte eine Bindung von D1-Protein in Höhe von ca. 10 RU bei Fraktion 31 und 8 RU bei Fraktion 33 detektiert werden (hier nicht graphisch dargestellt). Dies entsprach einem Konzentrationsbereich von 47-48 % (Fraktion 31) und 50-52 % (Fraktion 33) 1-Propanol. In diesem Elutionsbereich wurde auch über die Methoden der SDS-PAGE, des Western-Blottings und der SPR-Messungen mit dem Anti-D1-Antikörper-Chip D1-Protein nachgewiesen (s. Abschn. 3.3.1.2 und 3.3.2). In allen anderen getesteten Fraktionen (1-30, 32 und 34-62) wurde kein Nachweis von D1-Protein mit dem Simazinderivat-Chip erzielt.

3.4.5.4 Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse der SPR-Messungen mit dem Simazinderivat-Chip

Mit der Entwicklung der Methode zum qualitativen Nachweis von Herbizid-bindefähigem D1-Protein konnte die Erhaltung der Bindefähigkeit der Q_B-Bindenische des D1-Proteins zu Simazin belegt werden. Damit wurde hier bewiesen, dass das D1-Protein nicht nur über die Aufreinigungsmethode isoliert werden, sondern dass es darüber hinaus noch in einem funktionell Herbizid-bindefähigen Zustand aus dem PS-II-Proteinkomplex separiert werden kann. Die mit dem Simazinderivat-Chip nachgewiesenen Konzentrationsbereiche der D1-Protein-Elution in der FPLC-Aufreinigung deckten sich mit dem Nachweisbereich von D1-Protein in den SDS-PAGE-, Western-Blotting- und Anti-D1-Antikörper-Chip-Untersuchungen (Konzentrationsbereich von 41-75 % 1-Propanol).

Im Vergleich der drei Pflanzenspezies zeigte sich auch bei der Detektion von Herbizid-bindefähigem D1-Protein über den Simazinderivat-Chip *Vicia faba* als die Spezies mit dem höchsten Nachweis an D1-Protein, ein Ergebnis, das die Beobachtungen aus den zuvor beschriebenen Nachweismethoden bestätigt.

3.5 Zusammenfassende Betrachtung des Nachweises von D1-Protein über die Methoden der SDS-PAGE, des Western-Blottings und der SPR mit Anti-D1-Antikörper- und Simazinderivat-Chip

Mit allen hier verwendeten Methoden (SDS-PAGE, Western-Blotting, SPR mit Anti-D1-Antikörper-Chip und SPR mit Simazinderivat-Chip) konnte D1-Protein reproduzierbar bei allen Pflanzenspezies in einem Konzentrationsbereich von 41-75 % 1-Propanol in den FPLC-Aufreinigungen nach der Methode von Sharma *et al.* (1997a) detektiert werden. Das typische

Chromatogramm der D1-Protein-Aufreinigung aus den PS-II-Proteinkomplex-Extrakten zeigte reproduzierbar im Bereich zwischen 41-75 % 1-Propanol einen breiten Doppel- oder Multippeak, in dem das D1- mit dem D2-Protein koeluiert werden konnte. Dabei kam es reproduzierbar zu einer Elution des D1-Proteins in der hinteren Hälfte des Doppel-/ Multippeaks im Chromatogramm (s. Abschn. 3.3.1, 3.3.2 und 3.4.5). Im vorderen Bereich des Doppelppeaks konnten dagegen die höchsten Konzentrationen an D2-Protein eluiert werden. Eine Separation des D1-Proteins von dem in seinen Eigenschaften sehr ähnlichen D2-Protein war mit dieser Methode, in Übereinstimmung mit den Untersuchungen bei Sharma *et al.* (1997a), nicht möglich. Da aufgrund der geringen Menge an aufgereinigtem D1-Protein nicht ein und dieselbe FPLC-Aufreinigung mit allen vier Methoden parallel untersucht werden konnte, musste für jede Methode eine eigene FPLC-Aufreinigung verwendet werden. Damit kann der Nachweis von D1-Protein in dem teilweise etwas verschobenen und damit sehr breiten Elutionsbereich erklärt werden, der vom jeweiligen PS-II-Proteinkomplex abhing, aus dem das D1-Protein isoliert wurde. Insgesamt konnte der Elutionsbereich des D1-Proteins jedoch stets visuell über das Chromatogramm bestimmt werden (s. Abschn. 3.3.1, 3.3.2 und 3.4.5). Eine Variation des Gradienten mit verschiedenen isokratischen Schritten (s. Abschn. 2.5.1) führte zu keiner Verbesserung der Auftrennungsleistung. Die bestmögliche Separation wurde mit einem linearen Gradienten von 0 auf 100 % 1-Propanol über 60 min bei einer Flussrate von 0,5 ml/min erzielt.

Im Vergleich der Pflanzenspezies zeigte *Vicia faba* bei allen hier angewandten Methoden die höchsten Nachweise an D1-Protein. In den D1-Protein-Aufreinigungen konnte mit der SDS-PAGE und dem Western-Blotting bei *Vicia faba* eine deutlich höhere Menge an D1-Monomeren als bei den beiden anderen Spezies gefunden werden. Zusätzlich zeigten die PS-II-Proteinkomplex-Extrakte von *Vicia faba* als einzige überdies noch einen starken Nachweis an D1/D2-Dimeren, was den Gehalt an D1-Protein bei dieser Pflanzenspezies insgesamt noch erhöhte. Unterstützend war auch das Ergebnis, dass bei *Vicia faba* die höchsten qualitativen Nachweise von Herbizid-bindefähigem D1-Protein über den Simazinderivat-Chip erbracht werden konnten. Es wurde an dieser Stelle vermutet, dass die Bewahrung des Zusammenhalts der D1/D2-Dimere zur Stabilisierung der Q_B-Bindenische beiträgt und daher die höchsten qualitativen Nachweise bei dem isolierten D1-Protein von *Vicia faba* aufgrund der Bewahrung dieser Dimere erbracht werden konnten.

Wegen dieser Ergebnisse wurde das aufgereinigte D1-Protein aus *Vicia faba* für den Einsatz als biologische Einheit für den biosensorischen Nachweis von PS-II-Herbiziden mittels der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technologie ausgewählt.

3.6 Einsatz des D1-Proteins für den biosensorischen Nachweis von Herbiziden mit der Methode der Oberflächen-Plasmon-Resonanz

Abschließend wurde das aufgereinigte D1-Protein als biologische Einheit für den biosensorischen Nachweis von PS-II-Herbiziden mittels der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technologie eingesetzt. Über die Messmethode der Oberflächen-Plasmon-Resonanz sollte damit der spezifische, direkte Bindungsnachweis von verschiedenen PS-II-Herbiziden an die Q_B-Bindenische des D1-Proteins erfolgen. In diesem Fall wurde das isolierte D1-Protein an einen SPR-Chip immobilisiert, um damit den direkten biosensorischen Nachweis von PS-II-Herbiziden in wässrigen Lösungen zu ermöglichen.

Als zusätzlicher Vergleich wurden teilweise auch PS-II-Proteinkomplexe von *Vicia faba* und *Pisum sativum* über Aminkopplung auf einzelne Flusszellen eines SPR-Chips gebunden.

Die Messungen, beschrieben in Abschnitt 2.16.5.2, wurden mit einem „Small molecules screening assay“ mit einer selbst geschriebenen MDL-Methode (Method-Definition-Language-Methode) (s. Anhang 7.4) durchgeführt.

Als PS-II-Herbizide wurden exemplarisch die drei Herbizide Diuron, Atrazin und Metribuzin ausgewählt, da diese bei den Fluoreszenzmessungen mit der Puls-Amplituden-Modulation (PAM) von verschiedenen getesteten PS-II-Herbiziden die stärkste Anbindung an die Q_B-Bindenische von Chloroplasten-Thylakoiden aufwiesen (s. Abschn. 3.4.4, Trapmann, 1999; Schnabl *et al.*, 2000; Schnabl und Trapmann, 2001). Die Herbizide wurden dabei in einem Konzentrationsbereich von 10-100 µg/ml auf eine Anbindung an das am SPR-Chip immobilisierte D1-Protein und, in einigen Fällen, an die zusätzlich gebundenen PS-II-Proteinkomplexe getestet (s. Abschn. 2.16.5.2).

Um die Methode zu etablieren und zu optimieren, wurden diverse Bindungsexperimente mit mehreren D1-Protein-Chips und verschiedenen Isolaten von D1-Proteinen sowie PS-II-Proteinkomplexen durchgeführt. Es wurden ausschließlich D1-Protein-Aufreinigungen von *Vicia faba* als Liganden für die Bindungsexperimente am SPR-Chip ausgewählt, da sie sich aufgrund der vorhergehenden Ergebnisse als die für diese Experimente am besten geeigneten herausgestellt hatten (s. Abschn. 3.3, 3.4 und 3.5).

Das nach der Methodenetablierung und -optimierung zur Verfügung stehende Material reichte nur für Einzelbestimmungen mit zwei verschiedenen mit D1-Protein immobilisierten Chips aus; diese sind in den folgenden Abschnitten (3.6.1 und 3.6.2) beschrieben. Auf einen der Chips wurden parallel PS-II-Proteinkomplexe von *Vicia faba* und *Pisum sativum* gekoppelt. Bei den durchgeführten Experimenten konnte unabhängig voneinander auf den zwei Chips

eine Anbindung von PS-II-Herbiziden an das immobilisierte D1-Protein von *Vicia faba* bzw. einen PS-II-Proteinkomplex von *Vicia faba* nachgewiesen werden.

Allerdings konnte bei den untersuchten D1-Protein-Isolaten ein Bindungsnachweis mit Herbiziden nur bei einem aus *Vicia faba* isolierten D1-Protein (PS II 57 B) erbracht werden, das nach der PS-II-Extraktion gegen 5 % Essigsäure dialysiert (s. Abschn. 2.12) und nach der Methode von Sharma *et al.* (1997a) in der FPLC aufgereinigt worden war.

3.6.1 Biosensorischer Nachweis von Atrazin mit D1-Protein und PS-II-Proteinkomplexen mittels SPR

Abbildung 3.36 gibt eine Übersicht über die gemessenen Proben (lösungsmittel- sowie molekulargewichtskorrigiert) sowie die Messreihenfolge des small-molecules-Bindungsexperiments mit Atrazin (Mg = 216 Da) auf einem CM5-Chip mit immobilisierten D1-Proteinen (PS II 57 B) auf FC 2, PS-II-Proteinkomplexen von *Vicia faba* auf FC 3 und PS-II-Proteinkomplexen von *Pisum sativum* auf FC 4.

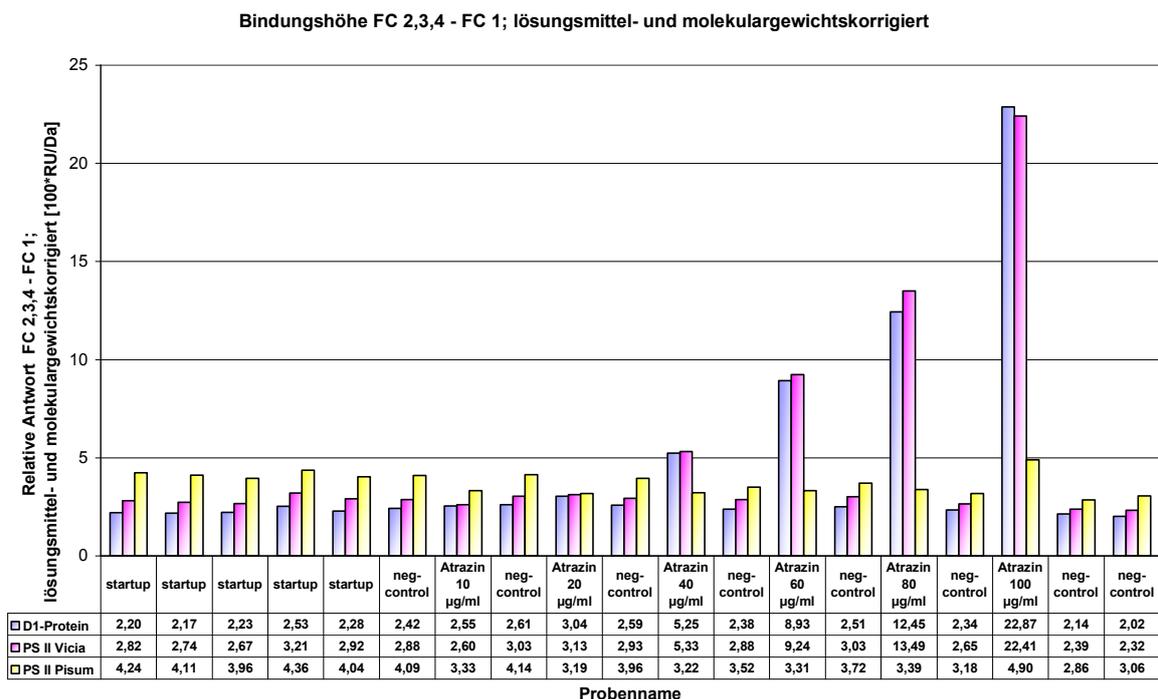


Abb. 3.36: Bindungshöhe FC 2,3,4 – FC 1 von 10-100 µg/ml Atrazin sowie Negativ-Kontrollen (negcontrol) und Startup-Injektionen (Startups), lösungsmittel- und molekulargewichtskorrigiert (RU). X-Achse: Probenname mit Datentabelle der lösungsmittel- und molekulargewichtskorrigierten Messwerte von FC 2,3,4 – FC 1 (RU). Y-Achse: Relative Antwort von FC 2,3,4 – FC 1 am Reportpunkt „bindlate“, lösungsmittel- und molekulargewichtskorrigiert (RU). D1-Protein = D1-Protein von *Vicia faba* (PS II 57 B), PS II Vicia = PS-II-Proteinkomplex aus *Vicia faba* (PS II 53 BL), PS II Pisum = PS-II-Proteinkomplex aus *Pisum sativum* (PS II 55 E1).

Tabelle 3.6 gibt eine Übersicht über die immobilisierten Liganden und ihre Kopplungsmengen auf dem CM5-Chip.

Flusszelle	Ligand	Kopplungsmenge	R _{max} theoretisch
FC 1	Blank mit EDC/NHS	156 RU	0 RU
FC 2	D1 aus den Fraktionen 28-38 von PS II 57 B	6072 RU	34,25 RU
FC 3	PS II 53 BL	9668 RU	8 RU
FC 4	PS II 55 E1	4617 RU	4 RU

Tab. 3.6: Übersicht über die immobilisierten Liganden und Kopplungsmengen auf dem CM5-Chip, R_{max} theoretisch: nach Formel 3.1 berechnet.

Nach der in Abschnitt 2.16.5.2 beschriebenen Lösungsmittel- und Molekulargewichtskorrektur sowie nach einem durchgeführten „double referencing“ konnte auf diesem Chip ab einer Konzentration von 40 µg/ml Atrazin auf FC 2 eine Anbindung von Atrazin an das D1-Protein von 2,66 RU nachgewiesen werden (s. Abb. 3.37). Die Bindungsmenge nahm mit steigender Konzentration an Atrazin proportional zu und zeigte bei einer Konzentration von 60 µg/ml 6,55 RU Anbindung, bei 80 µg/ml 9,93 RU Anbindung und bei 100 µg/ml 20,54 RU Anbindung (s. Abb. 3.37).

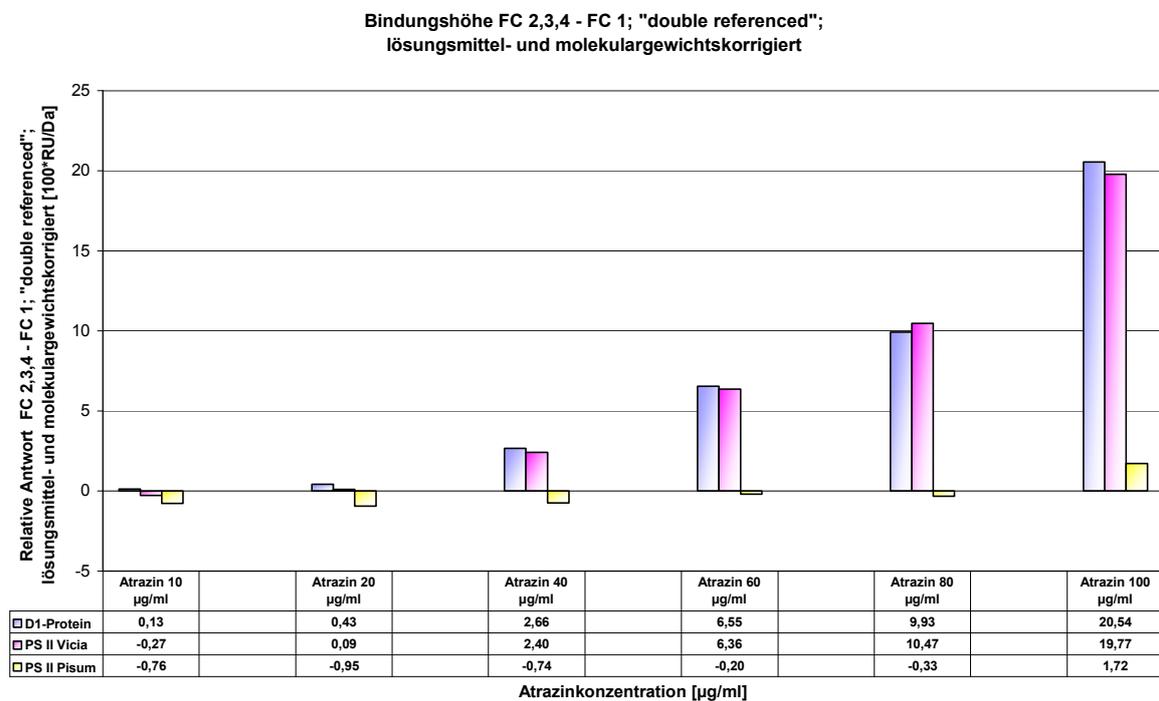


Abb. 3.37: Bindungshöhe FC 2,3,4 – FC 1 von 10-100 µg/ml Atrazin, „double referenced“, lösungsmittel- und molekulargewichtskorrigiert. X-Achse: Atrazinkonzentrationen (µg/ml) mit Datentabelle der „double referenced“ sowie lösungsmittel- und molekulargewichtskorrigierten Messwerte von FC 2,3,4 – FC 1 (RU). Y-Achse: Relative Antwort von FC 2,3,4 – FC 1 am Reportpunkt „bindlate“, „double referenced“ sowie lösungsmittel- und molekulargewichtskorrigiert (RU). D1-Protein = D1-Protein von *Vicia faba* (PS II 57 B), PS II Vicia = PS-II-Proteinkomplex aus *Vicia faba* (PS II 53 BL), PS II Pisum = PS-II-Proteinkomplex aus *Pisum sativum* (PS II 55 E1).

Ebenso konnte auf FC 3 eine Anbindung des Atrazins an die PS-II-Proteinkomplexe von *Vicia faba* (PS II 53 BL) nachgewiesen werden (s. Abb. 3.37). Auch hier war ein proportionaler Anstieg der Bindungsmenge mit steigender Atrazinkonzentration zu verzeichnen. Die Anbindungshöhe stieg von 2,4 RU bei 40 µg/ml Atrazin auf 19,77 RU bei 100 µg/ml Atrazin (s. Abb. 3.37). Es war, wie bei kleinen Molekülen üblich, keine Regeneration der Oberflächen mit Detergenzien oder Lösungsmitteln zwischen den verschiedenen Injektionszyklen notwendig. Die Regeneration der Messflächen erfolgte mit Laufpuffer, durch den die gebundenen Herbizide vom immobilisierten D1-Protein abgewaschen werden konnten. Bei den PS-II-Proteinkomplexen von *Pisum sativum* (PS II 55 E1) konnte hingegen kein Bindungsnachweis von Atrazin erbracht werden. Lediglich bei einer Konzentration von 100 µg/ml Atrazin war ein Signal von 1,72 RU zu messen (s. Abb. 3.37). Die PS-II-Proteinkomplexe von *Pisum sativum* waren damit hier als Negativ-Kontrolle zu dem D1-Protein und den PS-II-Proteinkomplexen von *Vicia faba* zu sehen. Bei diesen PS-II-Proteinkomplexen handelte es sich um die gleiche funktionelle Einheit mit identischer Größe und gleichen physikalischen Eigenschaften wie bei den PS-II-Proteinkomplexen von *Vicia faba*. Damit können sie als Negativ-Kontroll-Proteine angesehen werden.

Somit zeigte sich sowohl bei den PS-II-Proteinkomplexen als auch bei den aufgereinigten D1-Proteinen von *Vicia faba* die erhalten gebliebene Bindungsfähigkeit der Q_B-Bindenische unabhängig von der Struktur, in der das D1-Protein vorlag. Sowohl im Zusammenhalt des PS-II-Proteinkomplexes als auch als einzeln vorliegendes D1-Monomer bzw. D1/D2-Dimer war die gleiche funktionelle Bindefähigkeit an Atrazin nachzuweisen. Da die D1-Monomere und D1/D2-Dimere durch die hier verwendete FPLC-Aufreinigungsmethode nicht voneinander getrennt werden konnten (s. Abschn. 3.3), wurden bei den D1-Proteinen von *Vicia faba* sowohl D1-Monomere wie auch D1/D2-Dimere an der Chipoberfläche immobilisiert. Zu welchem Prozentsatz die D1-Proteine von *Vicia faba* auf der Chipoberfläche aus D1-Monomeren, aus D1/D2-Dimeren bzw. aus beiden bestanden, konnte nicht bestimmt werden, da sich aufgrund der Aufreinigungsmethode die beiden Konformationszustände nicht voneinander trennen ließen.

Als bemerkenswert war zu verzeichnen, dass über die Messtechnologie des Biacore® 3000 und über die Methode des „Small molecules screening assays“ Moleküle in der Größe von 215 Da nachgewiesen werden konnten, obwohl die Messungen sehr nah an der unteren Nachweisgrenze erfolgten.

3.6.2 Vergleich der Bindungsspezifität von Diuron, Atrazin und Metribuzin zu D1-Protein über den biosensorischen Nachweis mittels SPR

Auf einem weiteren Chip mit immobilisiertem D1-Protein aus der gleichen D1-Protein-Aufreinigung (PS II 57 B) von *Vicia faba* konnte ebenfalls ein Bindungsnachweis von Herbiziden erbracht werden. Hier wurde ein deutlicher Unterschied in der Bindungsspezifität zwischen den drei PS-II-Herbiziden Diuron, Atrazin und Metribuzin gefunden.

Das vereinigte D1-Protein aus den Fraktionen 28-38 des PS-II-Proteinkomplex-Extraktes 57 BW wurde mit einer Kopplungsmenge von 4375 RU an die Flusszelle 2 gebunden. Abbildung 3.38 zeigt eine Übersicht über das durchgeführte Small-molecules-Experiment mit den drei Herbiziden bei Herbizidkonzentrationen von 10-100 µg/ml sowie den Negativ-Kontrollen (negcontrol) und den Startup-Injektionen (Startups).

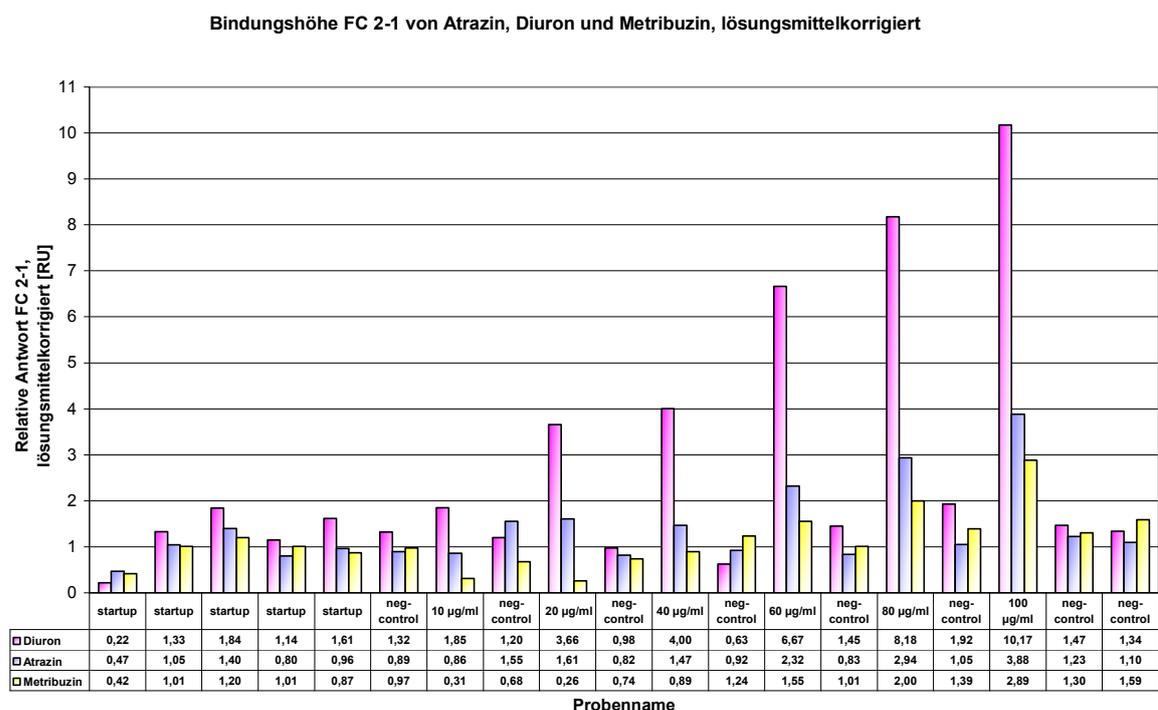


Abb. 3.38: Bindungshöhe FC 2-1 von 10-100 µg/ml Diuron, Atrazin und Metribuzin sowie Negativ-Kontrollen (negcontrol) und Startup-Injektionen (Startups), lösungsmittelkorrigiert. X-Achse: Probenname mit Datentabelle der lösungsmittelkorrigierten Messwerte von FC 2-1 (RU). Y-Achse: Relative Antwort von FC 2-1 am Reportpunkt „bindlate“, lösungsmittelkorrigiert (RU).

Nach einer durchgeführten Lösungsmittelkorrektur und „double referencing“ (s. Abb. 3.39) zeigte sich bei Diuron der deutlich höchste Bindungsnachweis. Bei einer Konzentration von 10 µg/ml war eine Antwort von 0,54 RU zu verzeichnen (s. Abb. 3.39). Die Bindungsmenge nahm mit ansteigender Diuronkonzentration kontinuierlich zu und erreichte 8,25 RU bei einer Konzentration von 100 µg/ml.

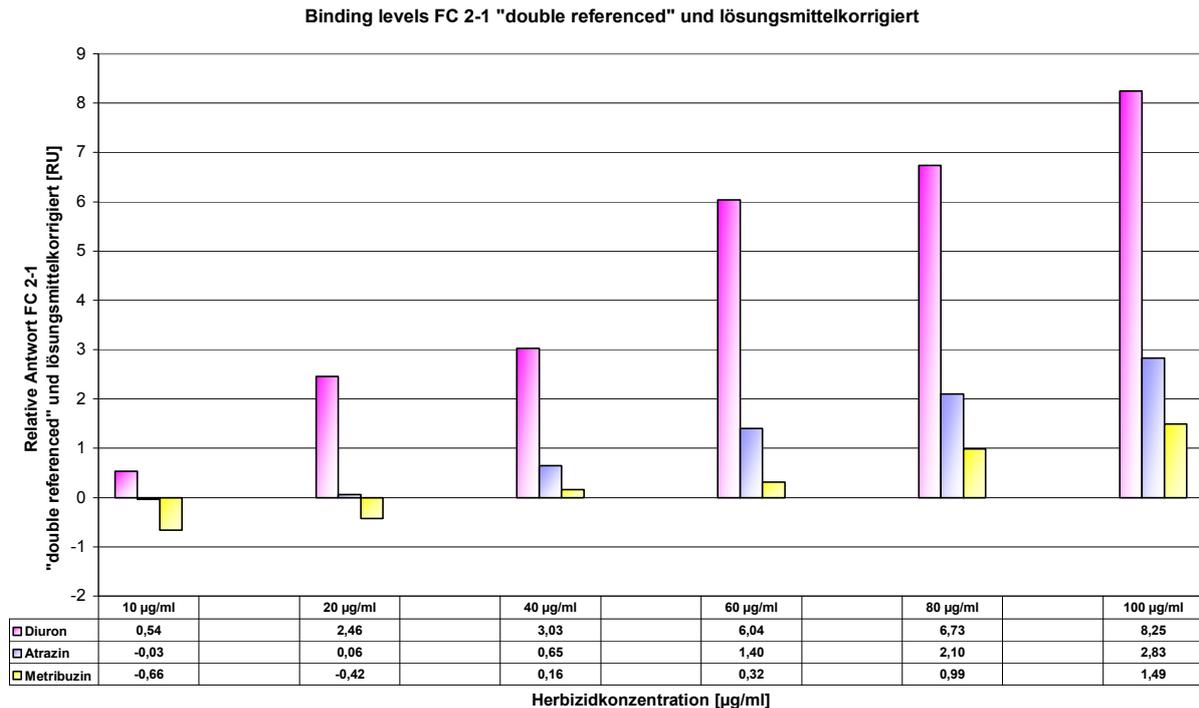


Abb. 3.39: Bindungshöhe FC 2-1 von 10-100 µg/ml Diuron, Atrazin und Metribuzin, „double referenced“ und lösungsmittelkorrigiert. X-Achse: Herbizidkonzentrationen (µg/ml) mit Datentabelle der „double referenced“ und lösungsmittelkorrigierten Messwerte von FC 2-1 (RU). Y-Achse: Relative Antwort von FC 2-1 am Reportpunkt „bindlate“, „double referenced“ und lösungsmittelkorrigiert (RU).

Atrazin wies die zweitgrößte Bindungsaffinität der getesteten Herbizide auf. Hier war erst ab einer Konzentration von 40 µg/ml ein Bindungssignal von 0,65 RU zu verzeichnen, das deutlich unter dem von Diuron mit 3,03 RU lag. Bei der Erhöhung der Konzentration stieg das Bindungssignal proportional an; bei einer Atrazinkonzentration von 100 µg/ml wurden 2,83 RU gemessen. Metribuzin zeigte nur eine sehr schwache Bindungsaffinität zu dem immobilisierten D1-Protein. Hier war erst bei einer Konzentration von 60 µg/ml eine Antwort von 0,32 RU zu verzeichnen, die auf maximal 1,49 RU bei einer Konzentration von 100 µg/ml Metribuzin anstieg.

Betrachtete man die bereits lösungsmittelkorrigierten und „double referenced“ Messwerte nach einer Molekulargewichtskorrektur (s. Abb. 3.40), blieb die Rangfolge innerhalb der drei getesteten Herbizide erhalten; die Unterschiede zwischen den Messwerten der drei Herbizide verringerten sich jedoch. Abbildung 3.40 zeigt die lösungsmittel- sowie molekulargewichtskorrigierten und „double referenced“ Messwerte. Auch hier war bei Diuron ab einer Konzentration von 20 µg/ml ein Bindungssignal zu beobachten, das von 1,05 RU auf 3,54 RU bei einer Diuronkonzentration von 100 µg/ml anstieg. Wie bei den nur lösungsmittelkorrigierten Werten war bei Atrazin ebenfalls erst ab einer Konzentration von 40 µg/ml ein Bindungssignal von 0,3 RU zu verzeichnen, das stetig auf 1,32 RU bei einer

Atrazinkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ anstieg. Metribuzin zeigte nur das sehr schwache Signal von 0,7 RU bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$.

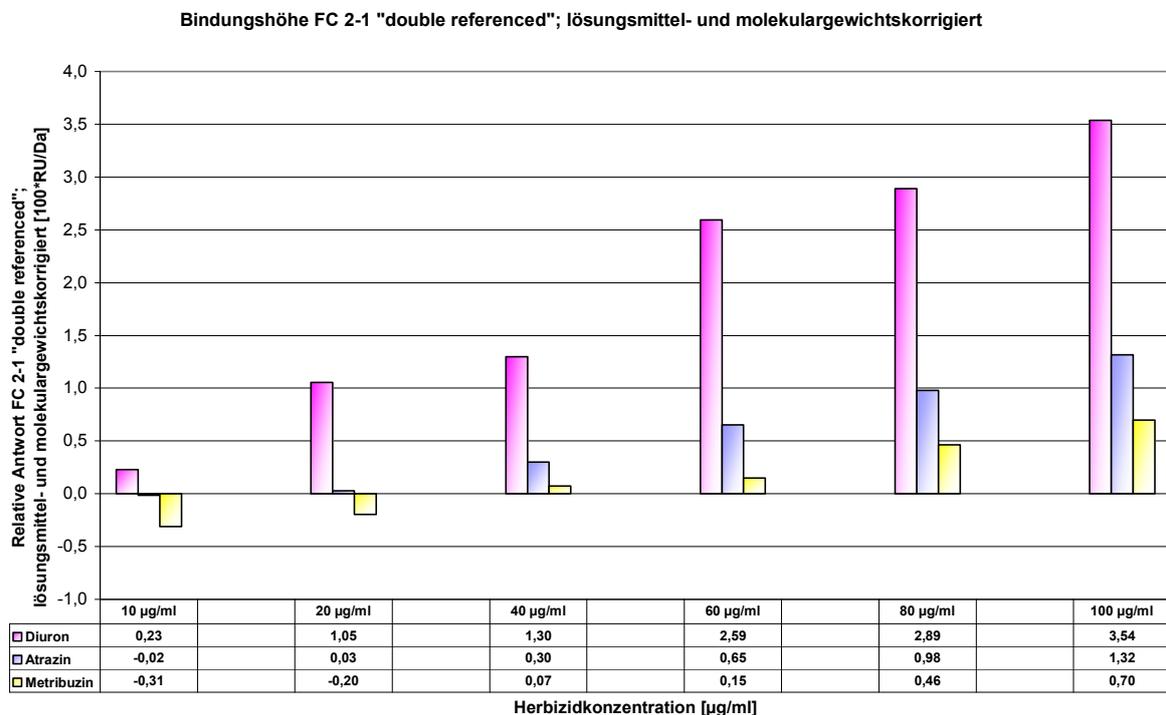


Abb. 3.40: Bindungshöhe FC 2-1 von 10-100 $\mu\text{g/ml}$ Diuron, Atrazin und Metribuzin, „double referenced“ und lösungsmittel- sowie molekulargewichtskorrigiert. X-Achse: Herbizidkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) mit Datentabelle der „double referenced“ und lösungsmittel- sowie molekulargewichtskorrigierten Messwerte von FC 2-1 (RU). Y-Achse: Relative Antwort von FC 2-1 am Reportpunkt „bindlate“, „double referenced“ und lösungsmittel- sowie molekulargewichtskorrigiert (RU).

Die hier gefundene Abstufung in der Bindungsspezifität der drei untersuchten PS-II-Herbizide entsprach der, die auch mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor nachgewiesen werden konnte (s. Abschn. 3.4.4; Trapmann, 1999; Schnabl *et al.*, 2000; Schnabl und Trapmann, 2001). Auch dort zeigte sich der Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor am sensitivsten gegenüber Diuron, gefolgt von Atrazin und schließlich Metribuzin.

Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass das aufgereinigte D1-Protein sowie die PS-II-Proteinkomplexe von *Vicia faba* prinzipiell für den biosensorischen Nachweis von PS-II-Herbiziden und damit auch anderen Photosystem-II-Inhibitoren mit der Oberflächen-Plasmon-Resonanz geeignet sind. Den nachweisbaren Konzentrationsbereich der Herbizide gilt es jedoch noch zu optimieren.

3.7 SPR-MS-Kopplung am Beispiel des pflanzlichen Testsystems Peroxidase und Anti-Peroxidase-Antikörper

Für die geplante Kopplung des biosensorischen Nachweises von PS-II-Herbiziden über die Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) mit der chemischen Analytik über Massenspektrometrie (MS) wurde ein pflanzliches SPR-MS-Testsystem entwickelt. Mit diesem Testsystem sollte die Methode des Biacore analyte recovery getestet werden (s. Abschn. 2.17), da eine Optimierung des analyte recoverys mit dem D1-Protein-Herbizid-System aufgrund der geringen Größe der Herbizide sehr schwierig gewesen wäre. Zudem stand nicht genügend Material an D1-Protein zur Verfügung, das für die große Anzahl an durchgeführten Tests für die Methodenoptimierung notwendig gewesen wäre.

Als Testsystem wurden ein monoklonaler Anti-Peroxidase-Antikörper als Ligand an einem CM5-Chip und pflanzliche Horseradish-Peroxidase als Analyt zur Zurückgewinnung vom Biacore-Chip und für die Messung im Massenspektrometer ausgewählt (s. Abschn. 2.17). Mit diesem System sollte die Kapazität der Kopplung der beiden Systeme getestet und untersucht werden, ob es möglich ist, eine genügend hohe Menge an Analyten zu eluieren, um diese noch im MS nachweisen zu können. Dabei sollten im Besonderen die Elutionskapazität des von der Chipoberfläche zurückgewonnenen Analyten sowie die maximal mögliche Bindungskapazität des Analyten an die Chipoberfläche bestimmt werden, um damit einen Rückschluss auf das später geplante System D1-Protein ↔ PS-II-Herbizide ziehen zu können. Im Weiteren sollte geprüft werden, ob die Peroxidase auch noch nach der Zurückgewinnung von der Sensoroberfläche über die Massenspektrometrie detektiert werden kann. Dabei sollte auch evaluiert werden, ob die mit den Biacore-analyte-recovery-Messungen bestimmte Menge an zurückgewonnenem Analyt mit den im Massenspektrometer gemessenen Quantitäten übereinstimmt. Zusätzlich sollten geeignete Elutionsbedingungen ermittelt werden die mit den MS-Messungen kompatibel sind. All diese Untersuchungen wurden zu dem Zweck durchgeführt, Schlussfolgerungen für das geplante Biacore-MS-Kopplungs-System D1-Protein ↔ PS-II-Herbizid ziehen zu können. Nach der Evaluierung des Testsystems sollte diese Biacore-MS-Kopplung für die wirkungsbezogene Analytik von PS-II-Inhibitoren eingesetzt werden. Die zuvor im SPR-Biosensor an das D1-Protein gebundenen PS-II-Inhibitoren (z. B. PS-II-Herbizide) sollten über das Biacore analyte recovery eluiert und über eine daran angeschlossene massenspektrometrische Messung genau identifiziert werden, um eine genaue Aussage dazu treffen zu können, welcher PS-II-Inhibitor biosensorisch über das D1-Protein nachgewiesen werden kann. Dieses Ziel wurde für den zukünftigen Einsatz des D1-Protein-SPR-Biosensors z. B. in der Umwelt- und/oder Gewässeranalytik angestrebt.

3.7.1 Biacore analyte recovery von pflanzlicher Peroxidase – Bestimmung der Elutionsmenge über die SPR

Das Biacore analyte recovery wurde, wie in Abschnitt 2.17 beschrieben, mit dem Biacore® 3000 durchgeführt. Exemplarisch ist hier das analyte recovery einer Flusszelle, auf die 8.910 RU monoklonaler Anti-Peroxidase-AK gekoppelt worden war, dargestellt. Abbildung 3.41 zeigt das Sensorgramm des analyte recoverys von dieser Flusszelle. Bei dieser immobilisierten Ligandenmenge kann über Formel 3.1 bei einem Molekulargewicht der Peroxidase von 43.343 Da und des Anti-Peroxidase-AK von 150 kDa eine maximal mögliche Bindungskapazität (R_{\max}) von ca. 2.575 RU berechnet werden. Bei einer 10-minütigen Injektion von 400 $\mu\text{g/ml}$ Peroxidase konnten 1.407 RU Peroxidase an die Chipoberfläche gebunden werden, von denen 1.364 RU nach der Inkubation mit dem MS-kompatiblen Puffer noch zur Verfügung standen (s. Abb. 3.41). Die gebundene Menge an Peroxidase entsprach dabei ca. 55 % der maximal möglichen Bindungskapazität.

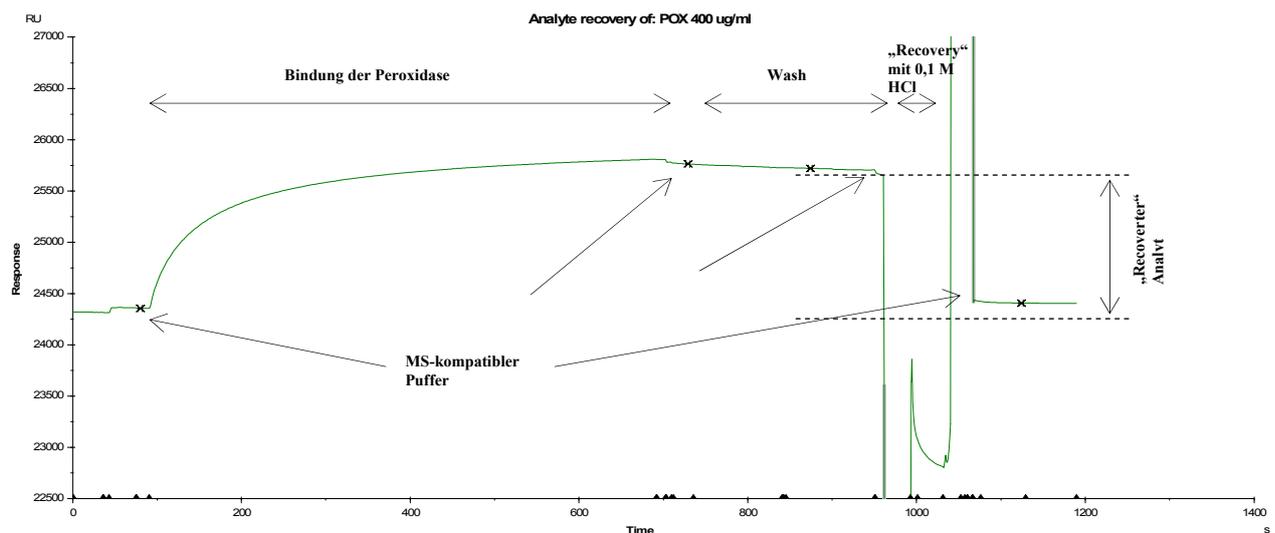


Abb. 3.41: Sensorgramm des analyte recoverys von 400 $\mu\text{g/ml}$ Peroxidase von einem mit Anti-Peroxidase-Antikörper immobilisierten CM5-Chip. X-Achse: Zeit in (s), y-Achse: SPR-Antwort in (RU).

Nach der 30 Sekunden dauernden Inkubation mit der „Recovery“-Lösung, 0,1 M HCl, konnten 1.313 RU Peroxidase von der Flusszelle zurückgewonnen werden. Das analyte recovery wurde noch zweimal auf derselben Flusszelle wiederholt, wobei im Anschluss 1.125 RU und 1.066 RU zurückgewonnen werden konnten. Die eluierte Lösung von je 2 μl wurde jeweils auf den gleichen, mit einer Sinapinsäure-Matrix vorpräparierten Spot auf einer MALDI-Platte getropft (s. Abschn. 2.17). Damit konnten insgesamt 3.504 RU „recovert“ werden, die einer Menge von 3,5 ng bzw. 80 fmol gleichgesetzt werden können, da eine SPR-Antwort von 1.000 RU äquivalent zu einer Änderung der Oberflächen-Proteinkonzentration

von 1 ng/mm^2 ist (BIAtechnology Handbook, 1998). Da eine Flusszelle eine Dimension von $2,1 \text{ mm} \times 0,5 \text{ mm}$ ($= 1,05 \text{ mm}^2$) besitzt, entspricht die in der Flusszelle gemessene Antwort an Peroxidase von 3.504 RU also einer Proteinmenge von ca. 3,5 ng.

3.7.2 Massenspektrometrische Messungen der eluierten pflanzlichen Peroxidase – Massenspektrometrische Bestimmung der Elutionsmenge

Unmittelbar nach dem Biacore analyte recovery wurde die eluierte Peroxidase massenspektrometrisch untersucht. Die Durchführung der Messungen ist in Abschnitt 2.17.3 beschrieben.

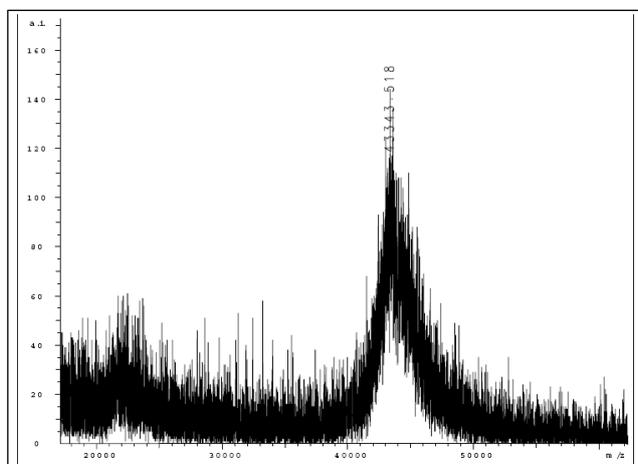


Abb. 3.42: Massenspektrum von ca. 3,5 ng (80 fmol) Peroxidase, eluiert vom Biacore-Chip mit $6 \mu\text{l}$ 10 mM HCl, auf einer Sinapinsäure-Matrix, $[\text{Peroxidase} + \text{H}]^+ = 43.343 \text{ Da}$. X-Achse: Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z), y-Achse: relative Intensität.

Ab einer Nachweisgrenze von ca. 2,5 ng Peroxidase pro MALDI-Spot konnte die Peroxidase im Massenspektrometer detektiert werden. Abbildung 3.42 zeigt exemplarisch das Massenspektrum der mit dem Biacore analyte recovery von der Flusszelle in drei Zyklen zurückgewonnenen Peroxidase (s. Abschn. 3.7.1). Der $[\text{Peroxidase} + \text{H}]^+$ -Komplex konnte bei einer Masse von 43.343 Da im Massenspektrometer nachgewiesen werden.

In Abbildung 3.43 sind massenspektrometrische Referenzmessungen von 2 ng (50 fmol) und 4 ng (100 fmol) Peroxidase dargestellt, auf die das Massenspektrum der eluierten Peroxidase bezogen werden kann.

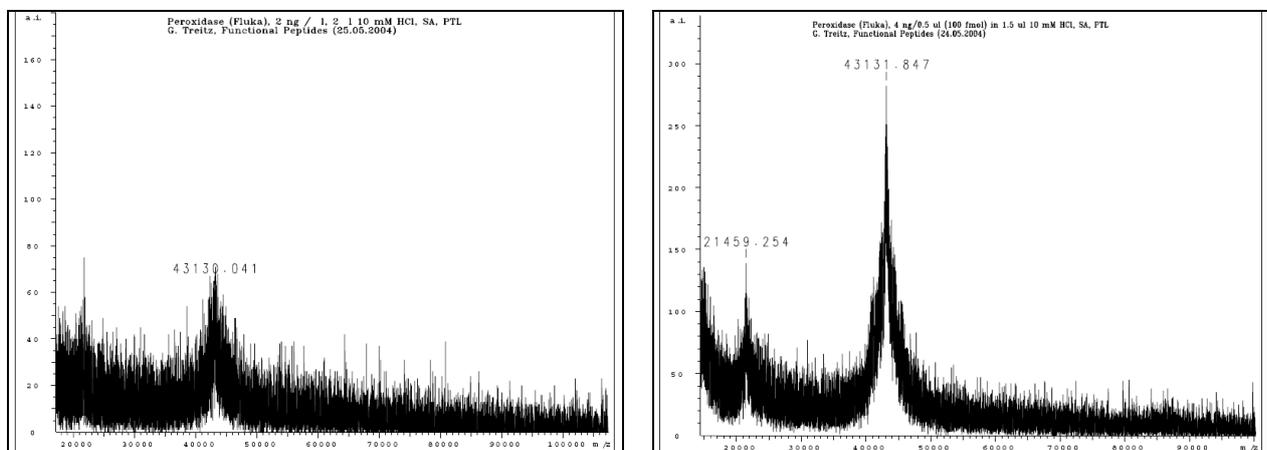


Abb. 3.43: Massenspektren von Kontrollmessungen mit pflanzlicher Peroxidase (Fluka, Buchs, CH). Links: 2 ng (50 fmol) in $2 \mu\text{l}$ 10 mM HCl und rechts: 4 ng (100 fmol) in $2 \mu\text{l}$ 10 mM HCl, beide auf einer Sinapinsäure-Matrix. X-Achse: Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z), y-Achse: relative Intensität.

Beim Vergleich der drei Spektren zeigt sich, dass der aus dem Biacore analyte recovery ermittelte Wert von 3,5 ng (80 fmol) mit den Verhältnissen der im Massenspektrum bestimmten Intensitäten übereinstimmte (s. Abb. 3.42 und 3.43).

Die Peroxidase konnte massenspektrometrisch jedoch nur nachgewiesen werden, wenn HBS-N-Puffer, sowohl als Flusssystem-Waschlösung 1 und 2 wie auch als Sensorchip-Waschlösung, sowie als MS-kompatibler Puffer benutzt wurde (s. Abschn. 2.17). Wurde 50 mM Ammoniumbicarbonat als Sensorchip-Waschlösung und 50 mM NaOH bzw. HBS-N-Puffer als Flusssystem-Waschlösung 1 sowie 50 mM Ammoniumbicarbonat als Flusssystem-Waschlösung 2 verwendet, konnte trotz erfolgreichen analyte recoverys über die MS keine Peroxidase nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass, sofern das analyte recovery über alle vier Flusszellen gleichzeitig durchgeführt wurde, die zurückgewonnene Menge auf den separaten Flusszellen deutlich unter der lag, die bei dem analyte recovery über einzelne Flusszellen gemessen werden konnte. Ferner wurde bei einem analyte recovery über alle vier Flusszellen der Ligand auf der Flusszelle 4 so gravierend beeinträchtigt, dass bei weiteren „Recovery“-Zyklen nur noch geringe Mengen oder gar keine Peroxidase mehr gebunden wurde und damit auf Flusszelle 4 auch kein Analyt mehr zurückgewonnen werden konnte. Damit ging Flusszelle 4 beim analyte recovery über alle vier Flusszellen für weitere „Recovery“-Zyklen verloren, so dass sich die Kapazität der eluierten Menge an Analyt um ein Viertel verringerte, was einen deutlichen Verlust darstellte.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Biosensors, basierend auf der biologischen Einheit eines Herbizid-bindefähigen D1-Proteins aus dem Photosystem II höherer Pflanzen, zum Nachweis von Photosystem-II-inhibierenden Substanzen. Grundlage dafür war die Isolierung eines D1-Proteins mit einer funktionell intakten und Herbizid-bindefähigen Q_B-Bindenische.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde daher eine Aufreinigungsmethode entwickelt, über die es möglich ist, funktionell intaktes D1-Protein mit einer bindefähigen Q_B-Bindenische für PS-II-Inhibitoren zu isolieren.

Im Mittelpunkt des zweiten Teils stand der Einsatz des isolierten Zielproteins für die Entwicklung eines Biosensors auf der Basis der SPR-Technologie zum wirkungsbezogenen Nachweis von phytotoxischen Substanzen, z. B. von PS-II-Herbiziden und ihren eventuellen Abbauprodukten.

Der strukturelle Aufbau des photosynthetischen Apparates in der Thylakoidmembran ist prinzipiell bei allen höheren Pflanzen gleich. Im Detail lassen sich jedoch spezifische Unterschiede zwischen den Pflanzenspezies und sogar Varietäten finden. Das D1-Protein als Bindeprotein für phytotoxische Substanzen im PS II ist hoch konserviert innerhalb der verschiedenen Phyla und weist Homologien in der Aminosäuresequenz von bis zu 80 %, zwischen so verschiedenen Organismen wie den Angiospermen und Cyanobakterien auf (Svensson *et al.*, 1991; Jansson u. Mäenpää, 1997). Dennoch finden sich spezifische Unterschiede und das selbst innerhalb der höheren Pflanzen, wie z. B. zwischen den in dieser Arbeit untersuchten Pflanzenspezies *Spinacea oleracea*, *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Lactuca sativa* sowie weiteren, wie beispielsweise *Oryza sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Brassica napus*, *Hordeum vulgare*, *Secale cereale* (Svensson *et al.*, 1991; Jansson u. Mäenpää, 1997). Besonders die Transmembran-Helix IV und die III-IV-Helix, die membranparallel auf der luminalen Seite der Thylakoidmembran liegt, sind beinahe vollständig konserviert (Svensson *et al.*, 1991). Die Q_B-Bindenische, die im IV-V-Loop des D1-Proteins liegt, ist dagegen weniger hoch konserviert und zeigt größere Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies (Sinning *et al.*, 1989; Svensson *et al.*, 1991; Jansson u. Mäenpää, 1997; Oettmeier, 1999) (s. Abschn. 1.2).

Diese Unterschiede können Modifikationen der Q_B-Bindenische bewirken, der Bindestelle für PS-II-Herbizide im hier untersuchten D1-Protein (s. Abschn. 1.3), und können damit zu Änderungen im Bindeverhalten zwischen dem D1-Protein und den PS-II-Herbiziden führen.

Mutationen im Bereich der Q_B-Bindenische können sogar eine totale Herbizidresistenz bewirken (Sinning *et al.*, 1989; Svensson *et al.*, 1991; Jansson u. Mäenpää, 1997; Oettmeier, 1999) (s. Abschn. 1.3). Daher galt in dieser Arbeit neben der Isolation von bindefähigem D1-Protein besonderes Interesse dem Vergleich verschiedener Pflanzenspezies in Hinblick auf ihren Gehalt an D1-Protein und die Bewahrung von dessen Funktionsfähigkeit. Dazu wurden exemplarisch *Vicia faba* als die am Institut für Molekulare Biotechnologie und Physiologie der Pflanzen (IMBIO) etablierte Testpflanze sowie *Pisum sativum* und *Spinacea oleracea* als in der Literatur hauptsächlich verwendete Pflanzen zur Untersuchung des Photosystems II ausgewählt. Zusätzlich wurde *Lactuca sativa* mit in die Untersuchungen einbezogen.

Im Weiteren können die Isolation negativ beeinflussende, abbauende Proteasen und sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie z. B. Polyphenole in verschiedenen Pflanzenspezies variieren (Chapman *et al.*, 1991), was einen zusätzlichen Aspekt für den Vergleich unterschiedlicher Spezies darstellt. So ist z. B. *Spinacea oleracea* sehr gut für die Isolation von aktiven photosynthetischen Membranen geeignet, da sie fast vollkommen frei von die Isolation und Stabilität störenden Phenolen ist (Leegood und Walker, 1988). Phenole sind die Substrate für die Polyphenol-Oxidasen, die einen negativen Einfluss auf die Stabilität der Isolate ausüben (Bolwell, 2001). Daher ist *Spinacea oleracea* in der Literatur auch häufig zur Aufreinigung von photosynthetischen Einheiten verwendet worden.

Neben diesem Vergleich standen verschiedene Methoden der Thylakoidmembranisolation sowie verschiedene Methoden der chromatographischen Aufreinigung von D1-Proteinen aus PS-II-Proteinkomplexen im Mittelpunkt der Untersuchungen.

Zu den besonderen Anforderungen dieser Arbeit gehörte die Entwicklung einer Aufreinigungsmethode, die ein Herbizid-bindefähiges D1-Protein mit einem hohen Reinheitsgrad und guter Ausbeute für biosensorische Messungen liefert. Dabei wurde die Zielsetzung verfolgt, eine möglichst zeitsparende und kostengünstige Aufreinigungsmethode zu finden, da für einen späteren Praxiseinsatz des Proteins im Biosensor große Mengen an D1-Protein benötigt werden.

Die Schwierigkeit der Aufreinigung lag darin, dass es sich bei dem D1-Protein um ein membrangebundenes Protein mit fünf in der Thylakoidmembran eingebetteten Transmembran-Helices handelt, eingebunden in den hochkompliziert aufgebauten PS-II-Proteinkomplex (s. Abschn. 1.1 und 1.2). Das D1-Protein ist in diesem Proteinkomplex über verschiedene Wechselwirkungen hochgradig mit anderen Proteinen verbunden, so etwa mit dem D2-Protein, das mit ihm in diesem Komplex ein Dimer bildet (s. Abschn. 1.1 und 1.2).

4.1 Beurteilung der Thylakoidisolation und PS-II-Proteinkomplex-Extraktion für die Verwendung des D1-Proteins als biologische Einheit in einem SPR-Biosensor

Da eine der Hauptaufgaben dieser Arbeit in der Aufreinigung eines funktionell intakten, bindefähigen D1-Proteins für die spätere Verwendung in einem Biosensor zum Nachweis von PS-II-Herbiziden lag, war es von besonderer Wichtigkeit, durch den Vergleich verschiedener Aufreinigungsmethoden eine geeignete Isolationsmethode zu finden, über die sich das D1-Protein schonend, schnell, bindefähig und in hoher Ausbeute gewinnen lässt. Solche Untersuchungen sind bislang nicht erfolgt.

Die grundlegenden Schwierigkeiten in der Isolation, Aufreinigung und Kristallisierung von Membranproteinen sind dafür verantwortlich, dass bisher nur wenige Familien von integralen Membranproteinen bekannt sind. Dazu zählen drei photosynthetische Proteinkomplexe: das Reaktionszentrum von Purpurbakterien (Deisenhofer *et al.*, 1984 und 1985; Deisenhofer und Michel, 1989; Lancaster und Michel, 1999), das Photosystem-I-Reaktionszentrum von Cyanobakterien (Krauss *et al.*, 1993) und der Photosystem-II-Proteinkomplex von Pflanzen (Spinat) (Rhee *et al.*, 1997 und 1998; Hankamer *et al.*, 2001). Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Isolation und wegen der schwierigen Bildung von Kristallen mit ausreichender Stabilität und Größe sind erst in den letzten Jahren dreidimensionale Strukturen von PS-II-Proteinkomplexen über Röntgen-Spektroskopie bestimmt worden (Holzenburg *et al.*, 1993; Santini *et al.*, 1994; Boekema *et al.*, 1995; Rhee *et al.*, 1997 und 1998; Nield *et al.*, 2000; Hankamer *et al.*, 2001) (s. Abschn. 1.1). Zuvor konnten nur zweidimensionale Strukturen vom Photosystem II über 2D-Kristalle erarbeitet werden, die über Elektronenmikroskopie untersucht wurden (Dekker *et al.*, 1990; Lyon *et al.*, 1993; Marr *et al.*, 1996; Nakazato *et al.*, 1996; Nicholson *et al.*, 1996; Tsiotis *et al.*, 1996) (s. Abschn. 1.1).

4.1.1 Vergleich der Thylakoidisolationmethoden

In der Literatur sind vielfältige Methoden zur Isolation von Thylakoidmembranen aus höheren Pflanzen sowie Cyanobakterien, Purpurbakterien, Rotalgen und Grünalgen beschrieben (Nakatani und Barber, 1977; Kuwabara und Murata, 1979; Berthold *et al.*, 1981; Satoh *et al.*, 1983; Bassi *et al.*, 1985; Barber *et al.*, 1987; Nanba und Satoh, 1987; Cohen und Baxter, 1990; Piletskaya *et al.*, 1997; Kuhl *et al.*, 2000; Roon *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2004; Mizusawa *et al.*, 2004). In dieser Arbeit wurden drei Methoden ausgewählt, um sie auf die Ausbeute an Photosystem-II-Proteinen (insbesondere an D1-Protein) zu untersuchen.

Die Methode abgewandelt nach Cohen & Baxter (1990) wurde in die Auswahl der Methoden einbezogen, da sie die am Institut für Molekulare Biotechnologie und Physiologie der Pflanzen (IMBIO) etablierte Methode darstellte (s. Abschn. 2.3.1). Mit nach dieser Methode isolierten Thylakoiden existieren jahrzehntelange Erfahrungen bei biosensorischen Messungen mit der Methode der Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometrie zum Nachweis von PS-II-Herbiziden aus diversen Medien, wie Wasser, Böden und Luft (Bausch-Weis, 1994; Bausch-Weis *et al.*, 1994; Trapmann *et al.*, 1998; Trapmann, 1999; Schnabl *et al.*, 2000; Trapmann *et al.*, 2000; Schnabl und Trapmann, 2001). Es lagen infolgedessen verwertbare Ergebnisse über die Funktionalität der Thylakoide und Untersuchungen zur Bindefähigkeit von PS-II-Herbiziden sowie anderen Inhibitoren der Q_B -Bindenische in großem Umfang vor (Bausch-Weis *et al.*, 1994; Trapmann *et al.*, 1998; Trapmann, 1999; Schnabl *et al.*, 2000; Schnabl und Trapmann, 2001). Aufgrund dieser Untersuchungen war bekannt, dass mit dieser Isolationsmethode noch funktionsfähige Thylakoide mit einer intakten photosynthetischen Elektronentransportkette isoliert werden können. Deshalb war die Wahrscheinlichkeit sehr groß, dass aus diesen Thylakoiden auch PS-II-Proteinkomplexe und im Folgenden auch D1-Proteine zu isolieren sind, die noch funktionell bindefähig für PS-II-Inhibitoren sind. Über die Modifikation der Isolationsmethode durch Zugabe von 20 mM $MgCl_2$ in das Isolationsmedium nach Zimmermann *et al.* (1996) konnten hier gestapelte Thylakoidmembranen und damit vornehmlich PS-II-reiche Granathylakoide isoliert werden.

Als zweite wurde die Methode nach Bassi *et al.* (1985) ausgewählt. Sie wurde getestet, da sie eine der wenigen in der Literatur beschriebenen Methoden ist, die mit einem Cocktail aus Proteaseinhibitoren arbeitet (s. Abschn. 2.5.2). Deshalb wurde erwartet, dass es bei dieser Methode zu einem im Vergleich zu den anderen verminderten Abbau des D1-Proteins durch Proteasen kommt und damit die Ausbeute an D1-Protein erhöht werden könnte.

Als dritte und den größten Erfolg versprechende Methode wurde die Isolation von Thylakoidmembranen nach Piletskaya *et al.* (1997) in den Vergleich einbezogen. Sie wurde aus der Vielzahl der Methoden ausgesucht, denn bei Piletskaya *et al.* (1999) konnte über ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) gezeigt werden, dass aus nach dieser Methode aufgereinigten Thylakoiden D1-Protein aufgereinigt werden konnte, dessen Bindefähigkeit zu PS-II-Herbiziden erhalten geblieben war. Zusätzlich ist bei Piletskaya *et al.* (1997 und 1999) eine sehr einfache, schnelle und kostengünstige Aufreinigung von D1-Protein beschrieben, die auf dieser Thylakoidisolationsmethode aufbaut. Damit galt dieser Isolationsmethode das Hauptaugenmerk.

Die Ergebnisse (s. Abschn. 3.1) zeigten, dass sich die Thylakoidisolationmethode nach Piletskaya *et al.* (1997) tatsächlich am besten für die spätere Aufreinigung von PS-II-Proteinkomplexen und D1-Protein eignete. Hier gab es keinen störenden Einfluss von BSA, wie er bei der Methode nach Cohen & Baxter (1990) zu verzeichnen war. Das dort in der Isolation als Proteasefänger eingesetzte BSA wird bei der anschließenden PS-II-Extraktion nicht ausgeschlossen und stört damit die Messung des Gesamtproteingehaltes wie auch die Auftrennung der Proben in der SDS-PAGE. Aufgrund des Anteils an BSA ist keine genaue Bestimmung des Gehaltes an PS-II-Proteinen in den Proben möglich. Dies stellt ein großes Problem für die D1-Protein-Aufreinigung dar. Es können auch später keine definierten Mengen an PS-II-Proteinkomplexen über die FPLC aufgetrennt werden, da die Proteinkonzentration nur zusammen mit dem BSA bestimmt werden kann und das BSA, wie im SDS-PAGE (s. Abb. 3.8) beobachtet, den Hauptteil an der Gesamtproteinkonzentration ausmacht.

Die Thylakoidisolation nach Bassi *et al.* (1985) erwies sich als die in der Durchführung aufwendigste und als die mit den schlechtesten Ergebnissen in der Thylakoidmembranausbeute (s. Abschn. 3.1). Es konnten hier zwar Proteinmengen isoliert werden, die tendenziell zwischen denen der Cohen & Baxter- (Cohen und Baxter, 1990) und der Piletskaya-Thylakoidisolationmethode (Piletskaya *et al.*, 1997) lagen; durch die sehr viel geringeren Ausbeuten an Thylakoidmembranen kann jedoch eine insgesamt sehr viel geringere Proteinausbeute, auf das Volumen bezogen, nicht ausgeglichen werden. Somit konnten hier keine Vorteile für die Verwendung von Proteaseinhibitoren gegenüber den beiden anderen Methoden gezeigt werden.

4.1.2 PS-II-Proteinkomplex-Extraktion

Satoh und Butler haben 1978 erstmalig PS-II-Proteinkomplexe aus Spinat isoliert, die aus drei Polypeptiden bestanden: das Chlorophyll-bindende-Protein CP43, ein 27-kDa-Protein und eine Untereinheit des Cytochroms *b-559*. 1987 haben Nanba und Satoh PS-II-Proteinkomplexe aus Spinat isoliert, die aus dem D1- und D2-Protein und Cytochrom *b-559* bestanden. Seitdem sind zahlreiche Methoden zur Isolation von PS-II-Proteinkomplexen entwickelt worden (Rögner *et al.*, 1987; Chapman *et al.*, 1988; Irrgang *et al.*, 1988; Haag *et al.*, 1990; Chapman *et al.*, 1991; Vitry *et al.*, 1991; Boekema *et al.*, 1995; Hankamer *et al.*, 1997a). Dabei konnten, abhängig von der Isolationsmethode, PS-II-Proteinkomplexe mit unterschiedlichen Anteilen an noch assoziierten Proteinen isoliert werden.

Zur Extraktion der PS-II-Proteinkomplexe wurde aus den zahlreich in der Literatur beschriebenen Methoden die Butanolextraktions-Methode nach Piletskaya *et al.* (1997) gewählt. Diese Methode erschien als viel versprechend für die hier verfolgte Anwendung, da ein Bindungsnachweis von aufgereinigten D1-Proteinen, die aus den nach dieser Methode isolierten PS-II-Proteinkomplexen isoliert worden waren, mit PS-II-Herbiziden beschrieben worden war (Chegel *et al.*, 1998; Piletskaya *et al.*, 1999). Bisher konnte an keiner anderen Stelle ein Nachweis der Bindung von isoliertem nativen D1-Protein mit PS-II-Inhibitoren gefunden werden. Zusätzlich wird diese PS-II-Isolationsmethode im Vergleich zu anderen als zeit- und kostensparend bei großer Ausbeute beschrieben (Piletskaya *et al.*, 1997 und 1999). Bei anderen in der Literatur beschriebenen Methoden zur Isolation von PS-II-Proteinkomplexen werden zum Teil sehr zeit- und arbeitsaufwendige Schritte aneinandergelinkt, beispielsweise bei den in der Arbeitsgruppe von Barber am Imperial College of Science, London, nach Nanba und Satoh (1987) entwickelten Methoden (Chapman *et al.*, 1988 und 1991), die in der Literatur vielfach angewandt und abgewandelt wurden (Barbato *et al.*, 1995; Vacha *et al.*, 1995; Zheleva *et al.*, 1996; Rhee *et al.*, 1997 und 1998; Sharma *et al.*, 1997a; Eshaghi *et al.*, 2000; Nield *et al.*, 2000; Hankamer *et al.*, 2001). Nach Chapman *et al.* (1988 und 1989) wird an eine Isolation von Thylakoidmembranen eine Anreicherung von PS-II-angereicherten **BBY**-Membranen (Granathylakoide nach Berthold, Babcock und Yocum (1981) isoliert) nach Berthold *et al.* (1981) angeschlossen; danach folgt die Isolation des PS-II-Reaktionszentrums über eine sehr komplizierte und isolationsabhängige Solubilisierung mit Triton X-100 und zum Schluss eine Aufreinigung über drei verschiedene Ionen-Austauscher-Chromatographie-Schritte. Ähnlich aufwendig sind viele weitere Methoden, wie sie z. B. bei Hankamer *et al.* (1997a) und Eshaghi *et al.* (1999) beschrieben werden, die an die Isolation von Thylakoidmembranen ebenfalls eine Anreicherung von BBY-Membranen anfügen und die PS-II-Proteinkomplexe mit einer zeitaufwendigen Dichtegradienten-Zentrifugation isolieren. Bei all diesen Methoden war jedoch die Ausbeute von geringerer Wichtigkeit, da für die weiteren Analysen keine großen Mengen an D1-Protein benötigt wurden.

Die meisten der beschriebenen Methoden verwenden Triton X-100 als Solubilisierungsmittel. Dieses wird jedoch in einigen Fällen als bedenklich für die Bewahrung der ursprünglichen Struktur der Membranproteine des PS II diskutiert. So konnten z. B. Roon *et al.* (2000) über elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass die über Triton X-100 isolierten BBY-Membranen eine völlig zufällige Orientierung ihrer PS-II-Superkomplexe zeigten. Dagegen zeigten mit *n*-Dodecyl- α -D-Maltosid isolierte Thylakoidmembranen einen hohen

Grad an zweidimensionaler Ordnung. Damit konnte nachgewiesen werden, dass Triton X-100 zu Veränderungen in der Anordnung der PS-II-Proteinkomplexe führt und damit die Nativität von einzelnen Proteinen des Komplexes zerstören kann. *N*-Dodecyl- α -D-Maltosid wurde dagegen als ein schonenderes Solubilisierungsmittel identifiziert (Roon *et al.*, 2000). Weder bei den mit Triton X-100 solubilisierten PS-II-Proteinkomplexen noch bei anderen Methoden wurde die Bewahrung der Bindefähigkeit von D1-Proteinen gegenüber PS-II-Herbiziden beschrieben. Vielmehr konnten Eshagi *et al.* (2000) zeigen, dass die über die sehr viel schonendere *n*-Dodecyl- β -D-Maltosid-Behandlung isolierten PS-II-LHC-II-Superkomplexe (Photosystem-II-Light-harvesting-complex-II-Superkomplexe) kein Diuron mehr binden konnten und die Struktur der Q_B -Bindenische modifiziert war. Zusätzlich wiesen sie nach, dass auch nur geringe Mengen an Plastochinon an die Q_B -Bindenische gebunden werden konnten, da das Plastochinon aufgrund der Modifizierung der Bindenische nicht mehr stabilisiert werden kann. Hankamer *et al.* (1997a) beschreiben ebenfalls eine schlechte Stabilität von über Triton X-100 isolierten PS-II-LHC-II-Superkomplexen. Dies waren Argumente dafür, den Isolationen über Detergenzien-Solubilisierung keinen Vorrang vor der Butanolextraktionsmethode einzuräumen.

Es wurde in dieser Arbeit der Methode der Butanolextraktion nach Piletskaya *et al.* (1997) den Vorzug gegeben, da bei Piletskaya *et al.* (1999) die Bewahrung der Herbizid-Bindefähigkeit des D1-Proteins, das aus dem nach dieser Methode isolierten PS-II-Proteinkomplexen aufgereinigt worden war, beschrieben wurde. Zusätzlich bot diese Methode den Vorteil, dass in einem Schritt sowohl Lipide als auch Pigmente von den PS-II-Proteinkomplexen entfernt werden können. Bei den Isolationsmethoden mit Detergenzien müssen die Pigmente im Anschluss über Dichtegradientenzentrifugation oder Gelfiltration abgetrennt werden. Vorteil der Verwendung einer nicht Detergenzien-haltigen PS-II-Proteinkomplex-Isolation war auch, dass die isolierten Extrakte direkt auf das SDS-PAGE zur Untersuchung aufgetragen werden konnten. Da SDS inkompatibel mit nicht-ionischen Detergenzien ist (Lottspeich und Zorbas, 1998), musste bei der hier angewendeten Methode nicht erst vorher ein Detergens entfernt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es besonders wichtig, dass eine D1-Protein-Aufreinigung gefunden wurde, die große Ausbeuten an D1-Protein bei einem hohen Reinheitsgrad liefert. Diese Zielsetzung konnte mit der Butanolextraktionsmethode nach Piletskaya *et al.* (1997) erreicht werden.

Über SDS-PAGE und Western-Blotting konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden (s. Abschn. 3.3.1), dass im Vergleich zu anderen in der Literatur beschriebenen Methoden zur

Isolation von PS-II-Proteinkomplexen mit der hier beschriebenen Butanolextraktionsmethode auf sehr viel schnellerem, kostengünstigerem und einfacherem Weg PS-II-Proteinkomplexe mit ausreichend hohen Proteinausbeuten isoliert werden konnten. Die Verwendung von Butanol als Solubilisierungsmittel anstelle von Detergenzien erwies sich als sehr effektiv und einfach in der Anwendung. Chapman *et al.* (1991) beschreiben, dass Isolationen ohne Detergenzien oft sehr viel reinere Isolate liefern als über Detergenzien-Behandlung erhaltene Präparationen. Die im SDS-PAGE gezeigte hohe Reinheit der Präparate über nur einen Solubilisierungsschritt mit Butanol erfüllt damit eine der Voraussetzungen, die für die Anwendung des D1-Proteins als biologische Einheit im Biosensor notwendig sind. An anderer Stelle (Nelson, 1982) konnte gezeigt werden, dass es über die Butanolextraktion möglich ist, ein funktionell aktives Protein der CF₀-Untereinheit (Transmembraner Protonenkanal der ATPase) der Thylakoid-ATPase (Thylakoid-Adenosintriphosphatase) zu isolieren. Das stützte die Annahme, dass auch das später noch aufzureinigende D1-Protein funktionell aktiv erhalten bleibt.

Über die durchgeführten SDS-PAGEs und Western-Blots konnte das D1-Protein in den PS-II-Proteinkomplexen spezifisch identifiziert werden (s. Abschn. 3.2). Eine Zuordnung der weiteren Proteinbanden in den SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte anhand der Literatur (Nixon *et al.*, 1986; Barber *et al.*, 1987; Nanba und Satoh, 1987; Vacha *et al.*, 1995; Nakazato *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 1997a und 1997b; Kuhl *et al.*, 2000; Komenda *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2004; Mizusawa *et al.*, 2004) (s. Abschn. 3.2). Es wurden keine der weiteren Proteine über einen Antikörper-Nachweis untersucht. Wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, konnten folgende Proteine in den PS-II-Proteinkomplexen gefunden werden: D1/D2-Dimere (ca. 62 kDa), die Core-Antennen-Proteine CP47 (ca. 47 kDa) und CP43 (ca. 43 kDa), D1-Protein-Monomere (ca. 36-39 kDa), D2-Protein-Monomere (ca. 32-33 kDa), die α -Untereinheit des Cytochroms *b-559* (ca. 9 kDa) und die β -Untereinheit des Cytochroms *b-559* (ca. 4,5 kDa). Damit wurden hier über die Butanolextraktionsmethode nach Piletskaya *et al.* (1997) nach der Definition von Hankamer *et al.* (1997b) Photosystem-II-Proteinkomplexe, bestehend aus dem PS-II-Reaktionszentrum inklusive den eng mit ihm assoziierten Antennen-Proteinen CP47 und CP43, isoliert (s. Abschn. 1.1 und 3.2). Die α - und β -Untereinheiten des Cytochroms *b-559* sowie die Antennen-Proteine CP47 und CP43 sind eng assoziiert mit dem D1- und D2-Protein (Moskalenko *et al.*, 1992; Barbato *et al.*, 1995; Hankamer *et al.*, 1997b). Dies ist eine mögliche Erklärung dafür, dass diese beiden Untereinheiten selbst bei dem kleinsten der zu isolierenden PS-II-Proteinkomplexe, dem PS-II-Reaktionszentrum, neben dem D1- und D2-Protein zu finden sind.

Obwohl das D1-Protein, wie Sharma *et al.* (1997a) über Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) nachgewiesen haben, ein Molekulargewicht von 38.033,6 Da in der nicht phosphorylierten Form und von 38.113,6 Da in der phosphorylierten Form besitzt (für *Pisum sativum*), ist es im SDS-PAGE bzw. Western-Blot, wie es bisher auch schon in der Literatur beschrieben wurde (Satoh *et al.*, 1983; Nixon *et al.*, 1986; Barber *et al.*, 1987; Nanba und Satoh, 1987; Chapman *et al.*, 1989; Hankamer *et al.*, 1997a; Sharma *et al.*, 1997a; Eshaghi *et al.*, 1999; Kuhl *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2004; Mizusawa *et al.*, 2004), auf der Höhe von ca. 32 kDa zu finden. Aufgrund der ersten Untersuchungen des D1-Proteins über SDS-PAGE nahm man daher zuerst (Satoh *et al.*, 1983) und noch viele weitere Jahre an, dass das D1-Protein ca. 32 kDa groß ist (s. Abschn. 1.2). Auf genomischer Ebene konnte jedoch bereits 1982 über die Gensequenz die Größe des D1-Proteins von *Spinacea oleracea* mit ca. 38.950 Da bestimmt werden (Zurawski *et al.*, 1982). In zahlreichen Untersuchungen, in denen die PS-II-Proteinkomplexe über SDS-PAGE aufgetrennt wurden (Satoh *et al.*, 1983; Nixon *et al.*, 1986; Barber *et al.*, 1987; Chapman *et al.*, 1989; Boekema *et al.*, 1999; Eshaghi *et al.*, 1999; Kuhl *et al.*, 2000), wird das D1-Protein jedoch mit einer molekularen Masse von ca. 32 kDa beschrieben. Dieses charakteristische Laufverhalten des D1-Proteins im SDS-PAGE könnte durch eine unvollständige Auffaltung der Proteine bei der Denaturierung mit SDS erklärt werden. Sind die Proteine unvollständig aufgefaltet, wandern sie schneller durch das Gel, als sie es auf Grund ihres Molekulargewichtes dürften (Lottspeich und Zorbas, 1998). Dies könnte auf die elektrostatischen Eigenschaften und die Hydrophobizität des Proteins zurückzuführen sein.

Die in dieser Arbeit beobachtete Lage des D1-Proteins im SDS-Polyacrylamidgel bei einem höheren Molekulargewicht als dem des D2-Proteins wurde bei Nixon *et al.* (1986) und Barber *et al.* (1987) erstmalig beschrieben. Sie konnten nachweisen, dass die Lage dieser zwei Proteine im SDS-PAGE von der Verwendung von Harnstoff abhängig ist. Ohne die Verwendung von Harnstoff im Gel, lief das D2-Protein mit einer geringeren molekularen Masse im Gel als das D1-Protein; bei Anwesenheit von 6 M Harnstoff beobachteten sie das Gegenteil. Da bei späteren Untersuchungen von Photosystem-II-Proteinen meistens ≥ 6 M Harnstoff im Gel verwendet wurde, findet man in den Veröffentlichungen das D1-Protein im SDS-Polyacrylamidgel meistens bei einer geringeren molekularen Masse als das D2-Protein (Sharma *et al.*, 1997a und 1997b). Kanervo *et al.* (2003) beobachteten ebenfalls den Lauf des D1-Proteins oberhalb des D2-Proteins im SDS-Polyacrylamidgel ohne Harnstoff. Da für die gelelektrophoretische Auftrennung in dieser Arbeit kein Harnstoff in den Gelen verwendet

wurde, kann darüber die hier gefundene Lage des D1-Proteins bei einem höheren Molekulargewicht als dem des D2-Proteins im SDS-Polyacrylamidgel erklärt werden.

4.1.3 Vergleich ausgewählter Pflanzenspezies

Auf genomischer Ebene ist eine Vielzahl von Untersuchungen durchgeführt worden, die das Photosystem II und das D1-Protein verschiedener Phyla, aber auch unterschiedlicher Spezies, u. a. innerhalb der höheren Pflanzen, vergleichen (Sinning *et al.*, 1989; Svensson *et al.*, 1991; Jansson *et al.*, 1997; Oettmeier, 1999). Im Gegensatz dazu gibt es auf proteomischer Ebene nur wenige vergleichende Untersuchungen des Photosystems II und/oder des D1-Proteins bei verschiedenen Spezies höherer Pflanzen.

Bis zu diesem Zeitpunkt wurden in der Literatur auf proteomischer Ebene nur Untersuchungen des Photosystems II von Rotalgen (Eukaryotische Algen) (Gao *et al.*, 2004), Purpurbakterien (Eubakterien) (Deisenhofer *et al.*, 1984), Grünalgen (Eukaryotische Algen) (Hippler *et al.*, 2001), Cyanobakterien (prokaryotische Algen) (Kuhl *et al.*, 2000; Komenda *et al.*, 2002; Mizusawa *et al.*, 2004) und einigen ausgewählten Spezies höherer Pflanzen (aus *Spinacea oleracea*: Nakazato *et al.*, 1996; Hankamer *et al.*, 1997a; Boekema *et al.*, 1999; Eshaghi *et al.*, 1999; aus *Pisum sativum*: Nixon *et al.*, 1986; Barber *et al.*, 1987; Vacha *et al.*, 1995) durchgeführt. Es wurden dabei PS-II-Proteinkomplexe mit variierender Komplexität in ihrer Proteinzusammensetzung isoliert (Hankamer *et al.*, 1997a und 1997b; Chapman *et al.*, 1991). Direkte Vergleiche beschränken sich auf das Photosystem II von Cyanobakterien (prokaryotische Algen) und höheren Pflanzen (Eukaryoten) (Boekema *et al.*, 1995; Hasler *et al.*, 1997).

Ein Vergleich von isoliertem D1-Protein unterschiedlicher Pflanzenspezies bzw. Organismen verschiedener Reiche und Phyla, im Besonderen ein Vergleich hinsichtlich der Funktionalität, war bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht erfolgt. Daher war einer der Kernpunkte dieser Arbeit der Vergleich verschiedener Spezies höherer Pflanzen in den verschiedenen Schritten der D1-Protein-Aufreinigung hinsichtlich der Ausbeute an D1-Protein. Als besonderer Schwerpunkt sollte dabei die Funktionalität des D1-Proteins verschiedener Pflanzenspezies anhand ihrer Bindefähigkeit zu PS-II-Herbiziden charakterisiert werden.

Unter den vier Pflanzenspezies wurde zuerst *Vicia faba* ausgewählt, da sie die am IMBIO etablierte Spezies darstellte, aus der die Thylakoidmembranen für den biosensorischen Nachweis von Herbiziden über die Puls-Amplituden-Fluorometrie gewonnen werden. Daher lagen mit dieser Pflanze die meisten Erfahrungen vor; so war schon nachgewiesen, dass sie auf der Stufe der Thylakoidmembranen noch Herbizid-binefähiges D1-Protein aufweist

(Bausch-Weis, 1994; Bausch-Weis *et al.*, 1994; Zimmermann *et al.*, 1996 und 1999; Trapmann *et al.*, 1998 und 2000; Schnabl *et al.*, 2000). Zusätzlich liefert *Vicia faba* einen hohen Anteil an photosynthetisch aktiven Blättern gegenüber der Restmasse (Trapmann, 1999), was für die hier benötigte Aufreinigung von großen Mengen an D1-Protein von erheblicher Wichtigkeit war. Als weitere Pflanzenspezies wurden *Spinacea oleracea* und *Pisum sativum*, speziell die Varietät *Feltham first*, ausgesucht, da sie die in der Literatur am häufigsten verwendeten Spezies der höheren Pflanzen sind (Nixon *et al.*, 1986; Barber *et al.*, 1987; Vacha *et al.*, 1995; Nakazato *et al.*, 1996; Hankamer *et al.*, 1997a; Rhee *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 1997a; Boekema *et al.*, 1999; Eshaghi *et al.*, 1999; Hankamer *et al.*, 2001). Zusätzlich wurde als weitere Testpflanze *Lactuca sativa* in die Untersuchungen einbezogen, eine Pflanzenspezies, über die in der Literatur keine proteomischen Untersuchungen zur PS-II-Isolation zu finden waren, die aber die Gewinnung großer Mengen an D1-Protein ohne größeren Planungsaufwand ermöglicht, da sie jederzeit auf dem Markt erworben werden kann.

Über den Vergleich der Pflanzenspezies sollte die für die Isolation des D1-Proteins am besten geeignete herausgefunden werden. Dabei war auch der mögliche Einfluss von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen auf die Qualität der Isolate einzubeziehen. So konnten Schlee *et al.* (1992) zeigen, dass *Vicia faba*-Pflanzen zwar einen hohen Chlorophyllgehalt aufweisen, aber auch sekundäre Inhaltsstoffe besitzen, die schon bei leichten Stressbedingungen für die Pflanze zu weniger aktiven Thylakoidisolaten führen.

Unter den ausgewählten Pflanzenspezies konnte mit den Methoden der Vitalitäts- und der Proteingehaltsbestimmung *Vicia faba* als die am besten geeignete Spezies herausgestellt werden, da sie tendenziell sowohl die höchsten Vitalitäten als auch die höchsten Proteingehalte aufwies (s. Abschn. 3.1.1 und 3.1.3). Koblizek *et al.* (1998) haben für isolierte PS-II-Proteinkomplexe von *Vicia faba* und *Pisum sativum* den Elektronentransport von H₂O zu dem künstlichen Elektronenakzeptor 2,6-Dichlorophenolindophenol (DCPIP) verglichen. Auch sie stellten bei *Vicia faba* eine höhere Aktivität fest. Die Beobachtung der höchsten Proteingehalte im Bradford-Test (s. Abschn. 3.1.3) konnte auch über die Untersuchungen der PS-II-Proteinkomplexe über SDS-PAGE und Western-Blotting bestätigt werden. Bei *Vicia faba* konnte aufgrund des Auftretens von D1/D2-Dimeren im SDS-Polyacrylamidgel/Western-Blot ein insgesamt höherer Gehalt an D1-Protein gefunden werden (s. Abschn. 3.2.1). Das Auftreten der D1/D2-Dimere bei *Vicia faba* und bei keiner der anderen getesteten Spezies stellt eine in der Literatur bisher noch nicht beschriebene Besonderheit dar.

Damit konnte schon auf der Ebene der PS-II-Proteinkomplexe deutlich gezeigt werden, dass *Vicia faba* von den untersuchten Spezies die höchsten Ausbeuten an D1-Protein liefern kann. Der Nachweis von dimeren Strukturen des D1/D2-Proteins im SDS-PAGE kann eventuell über eine stärkere Bindungsaffinität dieser beiden Proteine zueinander erklärt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Aminosäuresequenz der D1- und D2-Proteine verschiedener Pflanzenspezies (Svensson *et al.*, 1991; Jansson und Mäenpää, 1997; P06585 PSBA_PEA, 2006; P13910 PSBA_VICFA, 2006; P69557 PSBA_LACSA, 2006) ist es möglich, dass bei *Vicia faba* diese beiden Proteine über mehr Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind und deshalb über die Solubilisierung mit Butanol nach Piletskaya *et al.* (1997) nicht voneinander getrennt werden können. Gao *et al.* (2004) konnten bei den von ihnen isolierten PS-II-Proteinkomplexen aus der Rotalge *Porphyridium yezoensis* ebenfalls D1/D2-Dimere im SDS-PAGE finden, die sich selbst durch Solubilisierung mit dem harschen anionischen Detergens SDS nicht voneinander trennen ließen. Dies sahen sie als Bestätigung dafür, dass die Thylakoidmembranen von Rotalgen eine höhere natürliche Resistenz zu Detergenzien haben. Diese natürliche Resistenz gegen nicht-ionische Detergenzien, besonders gegen Detergenzien wie etwa dem Triton X-100, wurde ebenfalls bei Braunalgen gefunden (Anderson und Barrett, 1979; Liu *et al.*, 2004). Bei Piletskaya *et al.* (1997) konnten solche Dimere allerdings nicht gefunden werden, dort wurde jedoch nur mit der Spezies *Pisum sativum* gearbeitet. Damit decken sich die Befunde aus der Literatur (Piletskaya *et al.*, 1997) mit dem hier erzielten Ergebnis, dass bei *Pisum sativum* nur D1-Monomere und keine D1/D2-Dimere mit der Butanolextraktionsmethode isoliert werden können. Bei *Pisum sativum* scheint damit die Bindung zwischen dem D1- und D2-Protein schwächer zu sein, so dass diese über das SDS vollständig solubilisiert und aufgetrennt werden können.

Die Bewahrung von D1/D2-Dimeren bei *Vicia faba* hat eine große Bedeutsamkeit, da diese eine Alternative für D1-Monomere als biologische Einheit im Biosensor darstellen könnten. Da in der Literatur bekannt ist, dass die Bewahrung der ursprünglichen Form der Q_B-Bindenische stark von der Erhaltung der Tertiär- und Quartärstruktur abhängig ist (Trebst, 1986, 1987 und 1991), liegt die Vermutung nahe, dass die Q_B-Bindenische in den Dimeren eventuell funktionsfähiger erhalten bleibt als bei den D1-Monomeren (s. auch Abschn. 4.2.1). Daher könnte bei den Dimeren möglicherweise eine Bindefähigkeit zu PS-II-Herbiziden noch erhalten sein, wenn diese bei den D1-Monomeren der verschiedenen Pflanzenspezies verloren gegangen ist. Damit konnte *Vicia faba* hier als eine Alternative für den Einsatz der aus ihr isolierten D1-Proteine als biologische Einheit im Biosensor aufgezeigt werden.

Lactuca sativa stellte sich über die verschiedenen Testmethoden als die am wenigsten geeignete Pflanze dar (s. Abschn. 3.1 und 3.2). Sowohl die Proteingehalte als auch die Vitalität der Thylakoide waren geringer als bei den anderen untersuchten Pflanzenspezies. Auch im SDS-Polyacrylamidgel und Western-Blot der PS-II-Proteinkomplexe war kein höherer Gehalt an D1-Protein als bei den anderen Pflanzenspezies zu finden. Dies ist eventuell über eine geringere Menge an Photosystemen in den Thylakoidmembranen von *Lactuca sativa* zu erklären, die durch die sehr schwierige Anzucht von qualitativ hochwertigen Pflanzen dieser Spezies im Gewächshaus begründet werden könnte. Dies wird durch die Untersuchungen von Schlee (1992) und Trapmann (1999) unterstützt, die herausfanden, dass *Lactuca sativa*-Pflanzen weniger Chlorophyll pro Blattfläche als z. B. *Vicia faba*-Pflanzen besitzen.

Spinacea oleracea wurde in dieser Arbeit wegen der geringen Thylakoidmembran-Ausbeute und auch aufgrund der relativ schwierigen Anzucht nicht weiter als D1-Protein-Lieferant verwendet. Leegood und Walker (1988) konnten zeigen, dass sowohl die Ausbeute als auch die photosynthetische Aktivität von Chloroplasten, die aus *Spinacea oleracea*-Pflanzen isoliert wurden, stark von der Anzucht der Pflanzen abhängig ist. Sie beschreiben, dass die Anzucht von für die Isolation von photosynthetischen Einheiten geeigneten *Spinacea oleracea*-Pflanzen in diesen Breiten sehr schwierig ist. Die Pflanzen sind sehr empfindlich gegenüber Umweltfaktoren wie Licht und Temperatur. Leegood und Walker (1988) konnten erst nach langjähriger Erfahrung ein System entwickeln, mit dem sie Spinatpflanzen mit reproduzierbaren Chloroplastenaktivitäten anziehen konnten. Zusätzlich war die Qualität der Isolate auch abhängig von der Erntezeit. Nach der ersten Blüte oder tagsüber geerntete Pflanzen zeigten sehr schlechte Aktivitäten der Isolate. Dies konnte auf den hohen Gehalt an Stärke und Calciumoxalat zurückgeführt werden. Diese werden durch weiße Ringe im Thylakoidpellet nach der Zentrifugation sichtbar. Ähnliche Probleme konnten sowohl bei der Anzucht der in dieser Arbeit verwendeten Spinatpflanzen als auch bei der Thylakoidisolation aus *Spinacea oleracea* beobachtet werden. Daher könnten diese Faktoren eine Erklärung für die schlechten Thylakoidisolate und –ausbeuten bei *Spinacea oleracea* sein. Die bei der Isolation ausbleibende Bildung eines Pellets (s. Abschn. 3.1.1) kann eventuell über die Wachsschicht auf den Blättern der Pflanzen erklärt werden. Trapmann (1999) stellte bei der Isolation des von der Oberflächenstruktur her sehr ähnlichen Feldsalates (*Valerianella locusta*) die gleichen Probleme fest. Sie konnte dies durch das von der Blattoberfläche gelöste Wachs erklären, das die Bildung eines Pellets während der Zentrifugation verhinderte.

Ein Vergleich der beiden Varietäten von *Pisum sativum* wurde nicht weiter verfolgt, da aufgrund der Ergebnisse (s. Abschn. 3.1 und 3.2) keine signifikant wiederkehrenden Tendenzen zwischen beiden Varietäten beobachtet werden konnten. Nur in einer Hinsicht unterschieden sich die Varietäten: Bei der Varietät *Maiperle* konnte eine geringere Materialausbeute bei der Pflanzenanzucht festgestellt werden. Ein deutlicher Unterschied in der Proteinzusammensetzung beider Varietäten war nicht zu erwarten, da beide aus der gleichen Spezies stammen und damit genetisch sehr homolog sind. Leegood und Walker (1988) konnten feststellen, dass es zu keinen Unterschieden in der Aktivität von Isolaten photosynthetischer Einheiten zwischen den Varietäten der Spezies *Pisum sativum* kam. Sie stellten es als wichtiger heraus, eine hiesige Varietät zu wählen, die an die lokalen, jahreszeitlich bestimmten Lichtbedingungen angepasst ist. Ebenso zeigten sie optimale Anzuchtbedingungen als notwendige Voraussetzungen für eine gute Isolatqualität auf.

4.1.4 Einfluss ausgewählter Anzuchtbedingungen

Bei dem Vergleich der Anzuchtbedingungen mit und ohne künstliche Zusatzbelichtung zeigte sich bei der Spezies *Vicia faba* eine weitere Besonderheit auf. Anhand der durchgeführten Experimente konnten hier lichtabhängige Unterschiede in der Menge an D1/D2-Dimeren festgestellt werden (s. Abschn. 3.2).

Bei einem direkten Vergleich von parallelen PS-II-Proteinkomplex-Isolationen aus mit und ohne künstliche Zusatzbelichtung angezogenen Pflanzen (PS II 37 B und PS II 37 BL) zeigten sich über SDS-PAGE und Western-Blotting bei den mit künstlicher Zusatzbelichtung angezogenen Pflanzen geringere Mengen an D1/D2-Dimeren (s. Abschn. 3.2.1) (Schulten *et al.*, 2005). Zusätzlich konnten über die Proteingehaltsbestimmung tendenziell geringere Proteingehalte bei den Isolaten von Pflanzen, die mit künstlicher Zusatzbelichtung angezogen worden waren, gefunden werden (s. Abschn. 3.1.3). Diese Beobachtungen könnten als Hinweis auf ein „Photodamage“ gewertet werden. Studien mit photoinhibierten Proben von Blättern bis hin zu isolierten PS-II-Proteinkomplexen konnten bereits sehr früh aufzeigen, dass die erste Verletzungsstelle das Photosystem-II-Reaktionszentrum ist (Powles und Björkman, 1984; Tytler *et al.*, 1984; Barengi und Krause, 1985; Cleland und Critchley, 1985; Krause *et al.*, 1985; Arntz und Trebst, 1986; Cleland *et al.*, 1986; Theg *et al.*, 1986; Demeter *et al.*, 1987; Ohad *et al.*, 1988) bzw. nahe der Plastochinon-Bindestelle liegt (Kyle *et al.*, 1984; Nedbal *et al.*, 1986; Allakhverdiev *et al.*, 1987). Schon Chapman *et al.* (1989) konnten bei einer Bestrahlung von D1/D2-Cytochrom-*b559*-Komplexen mit einer Lichtstärke von $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ eine Abnahme der Intensität von D1- und D2-Proteinbanden im

SDS-Polyacrylamidgel feststellen; das galt sowohl für Monomere wie auch für Dimere. Zusätzlich beobachteten sie eine mit zunehmender Belichtungszeit ansteigende Aggregation der PS-II-Proteinkomplexe, wodurch die Proteine nicht in das Gel eindringen konnten und nicht aufgetrennt werden konnten. Nakajima *et al.* (1995) fanden ebenfalls bei PS-II-Komplexen von Spinat eine Abnahme des Gehalts an D1-Proteinen, damit verbunden eine Bildung von 23- und 16-kDa-Fragmenten sowie die Bildung einer 41-kDa-Bande, die als Addukt zwischen dem D1-Protein und der α -Untereinheit des Cytochroms *b-559* identifiziert werden konnte.

Auch Cai und Xu (2002) konnten nach Starklichtbehandlung ($2.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) eine signifikante Abnahme der Menge an D1-Protein in den Blättern von Sojabohnen (*Glycine max*) detektieren. Unter Starklicht-Bedingungen war dort ein Netto-Verlust an D1-Protein und/oder ein irreversibles „Photodamage“ von PS-II-Proteinkomplexen unvermeidbar, da die Rate an D1-Protein-Abbau die Neusyntheserate überstieg. Cai und Xu (2002) fanden auch, dass das Ausmaß des Abbaus an D1-Protein signifikant kleiner war als die Abnahme in der lichtgesättigten PS-II-Elektronentransportrate. Dieses erklären sie über eine Akkumulation von lichtgeschädigten D1-Proteinen. Auch Alfonso *et al.* (2004) konnten bei Zellsuspensionen von *Glycine max* durch Bestrahlung, sowohl mit $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ als auch mit $1.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, eine Abnahme der Menge an D1-Protein im SDS-Polyacrylamidgel feststellen, die unter Starklichtbedingungen stark beschleunigt war. Bei Lupínková *et al.* (2002) konnte bei *Synechocystis* die Bildung von Addukten aus D1-Protein und der α -Untereinheit des Cytochroms *b-559* beobachtet werden. Lupínková *et al.* (2002) schlossen aus ihren Ergebnissen, dass das Addukt das Produkt einer Reaktion zwischen dem oxidierten Histidin-252-Rest des D1-Proteins mit der N-terminalen Aminogruppe der Cytochrom- α -Untereinheit ist. Komenda *et al.* (2002) fanden heraus, dass diese Verbindung des D1-Proteins mit der α -Untereinheit des Cytochroms *b-559* durch eine Oxidation des D1-Proteins entsteht, die durch reaktive oxidative Spezies katalysiert wird. Sie beobachteten dabei ebenfalls eine Abnahme des D1-Proteins bei *Synechocystis* PCC 6803 durch Bestrahlung mit $250 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Eine solche Adduktbildung konnte bei den Experimenten mit höheren Pflanzen in dieser Arbeit nicht gefunden werden.

Bei den in der Literatur beschriebenen Untersuchungen zum „Photodamage“ am Photosystem II konnten häufig Abbauprodukte des D1-Proteins entdeckt werden. Nach dem heutigen Kenntnisstand nimmt man an, dass der Abbau des D1-Proteins eine mehrstufige proteolytische Reaktion ist (Andersson und Aro, 1997). Dabei wird vermutet, dass als erster

Schritt eine lichtinduzierte Konformationsänderung des D1-Proteins auftritt, damit die primäre Spaltungsstelle für Proteasen zugänglich wird (Kyle *et al.*, 1984; Mattoo *et al.*, 1984; Aro *et al.*, 1993; Andersson und Aro, 1997). Basierend auf der Detektion eines N-terminalen 23-kDa- und eines C-terminalen 10-kDa-Fragments nimmt man an, dass die primäre Spaltung des D1-Proteins hauptsächlich im stromalen Loop stattfindet, der die Transmembran-Helices IV und V des D1-Proteins verbindet (Greenberg *et al.*, 1987; Canovas und Barber, 1993; Kanervo *et al.*, 1998; Wiklund *et al.*, 2001). Haußühl *et al.* (2001) konnten DegP2 als Protease identifizieren, die die primäre GTP-abhängige (Guanosintriphosphat-abhängige) Spaltung des D1-Proteins im stromalen IV-V-Loop katalysiert. Sie konnten zeigen, dass das DegP2-Protein-Level durch Bestrahlung mit hoch-intensivem Licht zunahm, ebenso durch andere Stressfaktoren wie hohe Konzentrationen an NaCl und Austrocknung. Lindahl *et al.* (2000) konnten eine sekundäre Proteolyse des 23-kDa-Fragments durch die Metalloendopeptidase FtsH finden. Durch diesen Prozess kann dann eine neue Kopie des D1-Proteins in das Reaktionszentrum integriert werden, womit die photosynthetische Funktion wiederhergestellt werden kann.

Nach heutigem Stand der Forschung geht man davon aus, dass die lichtgeschädigten PS-II-Zentren aus den Grana- in die Stromathylakoidregionen migrieren, da dort die zwei primären Abbaufragmente (Barbato *et al.*, 1991) sowie die FtsH-Protease (Lindahl *et al.*, 1996) gefunden werden konnten. Zusätzlich sind in den Stromathylakoiden die neu synthetisierten D1-Protein-Vorformen zu finden, die nach dem derzeitigen Forschungsstand dort in die PS-II-Reaktionszentren eingebaut werden (Aro *et al.*, 1993; Wijk *et al.*, 1996).

Eine Erklärung dafür, dass in den Untersuchungen dieser Arbeit keine Abbaufragmente des D1-Proteins gefunden werden konnten, könnte durch die PS-II-Extraktionsmethode erklärt werden. Andreasson *et al.* (1988) und Juhler *et al.* (1993) zeigten, dass sie über die Behandlung von Thylakoidmembranen mit Ultraschall Granathylakoide anreichern konnten. Wegen der Verwendung von Ultraschall bei der PS-II-Extraktionsmethode nach Piletskaya *et al.* (1997) ist es möglich, dass die hauptsächlich in den Stromabereichen zu findenden Abbauprodukte durch die Butanolaufreinigung nicht mit extrahiert wurden.

Zusätzlich ist zu beachten, dass das in der Literatur beschriebene „Photodamage“ meist nur bei der Bestrahlung von isolierten Zelleinheiten (wie Zellsuspensionen oder isolierten PS-II-Komplexen) oder bei Pflanzen, die kurz vor den Untersuchungen bestrahlt worden waren, aufgezeigt werden konnte. Die hier untersuchten Pflanzen wurden von Anbeginn der Aufzucht entweder mit oder ohne die künstliche Zusatzbelichtung angezogen. Daher hatten die Pflanzen während ihrer Entwicklungszeit, sich den Umweltbedingungen anzupassen.

Damit könnte eine weitere Erklärung für den insgesamt höheren Gehalt an Photosystem-II-Proteinen bei den ohne künstliche Zusatzbelichtung angezogenen Pflanzen sein, dass die Pflanzen aufgrund von Lichtmangel mehr PS-II-Reaktionszentren gebildet haben, um das wenige vorhandene Licht besser ausnutzen zu können. Eine ähnliche Beobachtung kann man bei Schattenblättern feststellen. Sie besitzen besonders große Granathylakoidstapel, die aus bis zu 100 aufeinander gestapelten Thylakoiden bestehen können (Sitte *et al.*, 1991). Dies könnte auch eine Erklärung für die nicht gefundenen D1-Abbaufragmente sein, da es in diesem Falle zu keinem „Photodamage“ gekommen wäre. Genauere Untersuchungen zu diesen anzuchtbedingten Unterschieden wurden nicht durchgeführt, da sie nicht Thema der Arbeit waren.

4.2 Beurteilung der D1-Protein-Aufreinigung für die Verwendung des D1-Proteins als biologische Einheit in einem SPR-Biosensor

Untersuchungen zur am besten geeigneten Aufreinigungsmethode des D1-Proteins bei verschiedenen Pflanzenspezies sind bisher in der Literatur noch nicht beschrieben worden. Aufreinigungen des D1-Proteins sind bislang vor allem im Hinblick auf den strukturellen Nachweis bzw. die strukturelle Identifikation (Sharma *et al.*, 1997a und 1997b) untersucht worden. Die extrem hydrophoben Eigenschaften gekoppelt mit der strukturellen Komplexität des D1-Proteins machen es zu einem sehr schwer zu isolierenden und zu untersuchenden Protein (Sharma *et al.*, 1997b).

Lediglich zur Untersuchung der Funktionalität des Photosystems II bei verschiedenen Spezies sind diverse Untersuchungen bezüglich der am besten geeigneten Isolationsmethode erfolgt (Gounaris und Barber, 1985; Barber *et al.*, 1987; Rögner *et al.*, 1987; Chapman *et al.*, 1988; Haag *et al.*, 1990; Chapman *et al.*, 1991; Hankamer *et al.*, 1997a; Eshaghi *et al.*, 1999).

Der bisher einzige Nachweis der Aufreinigung von funktionell intaktem und Herbizidbindefähigem D1-Protein aus *Pisum sativum* wurde von Piletskaya *et al.* (1998 und 1999) über ELISA und potentiometrische Messungen und von Chegel *et al.* (1998) über eine selbst entwickelte SPR-Apparatur erbracht.

Ein Vergleich der Funktionalität von D1-Proteinen verschiedener Pflanzenreiche bzw. -spezies auf proteomischer Ebene konnte in der Literatur nicht gefunden werden; deshalb erfolgten gezielte Untersuchungen zu diesem Vergleich im Rahmen dieser Arbeit. Zusätzlich wurde noch kein Vergleich auf biosensorischer Ebene der Bindefähigkeit von aufgereinigtem D1-Protein verschiedener Pflanzenspezies an PS-II-Herbizide vorgenommen. Als einer der Schwerpunkte sollte daher in dieser Arbeit die Funktionalität des D1-Proteins verschiedener

Pflanzenspezies anhand ihrer Bindefähigkeit zu PS-II-Herbiziden mittels der Methode der SPR verglichen werden.

In dieser Arbeit konnte über die verschiedenen Methoden zur Charakterisierung nicht nur gezeigt werden, dass das D1-Protein über die hier entwickelte Methode isoliert werden kann, sondern darüber hinaus auch, dass es sich noch in einem funktionell Herbizid-bindefähigen Zustand befindet (s. Abschn. 3.3 und 3.4.5). Die D1-Proteine konnten dabei reproduzierbar in einem Konzentrationsbereich von 41-75 % 1-Propanol eluiert werden (Schulten *et al.*, 2005). Wichtig waren auch in diesem Aufreinigungsschritt wieder hohe Ausbeuten und eine gute Reproduzierbarkeit der Methode. Daher sollte auch hier die Pflanzenspezies mit der höchsten Ausbeute an Herbizid-bindefähigem D1-Protein gefunden werden.

Auch in diesem Aufreinigungsschritt galt es die schonendste Methode für die Isolation des D1-Proteins zu finden. In der Literatur sind für diese Aufreinigungsstufe vor allem chromatographische Aufreinigungsschritte beschrieben worden (Takahashi *et al.*, 1988; Chapman *et al.*, 1991; Piletskaya *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 1997a und 1997b). In dieser Arbeit wurde aus den verschiedenen möglichen chromatographischen Auftrennungsverfahren die Umkehrphasenchromatographie ausgewählt, da sie in der Literatur als eine besonders viel versprechende Methode für die Isolation von D1-Protein gefunden werden konnte. Dabei wurden hier parallel zwei verschiedene Auftrennungsverfahren miteinander verglichen, die Methode nach Piletskaya *et al.* (1997) über eine mobile Phase von 50 mM Tris-HCl zu 2-Propanol und die Methode nach Sharma *et al.* (1997a) mit einer mobilen Phase von 5 % Essigsäure zu 1-Propanol (s. Abschn. 2.5). Die Methode nach Piletskaya wurde bei der Auswahl als am besten geeignet betrachtet, da sie bei einem physiologischen pH-Wert von ca. 8,0, der dem in den Chloroplasten nahe kommt, die Proteine in der Säule auftrennen sollte (s. Abschn. 2.5.2). Nach Piletskaya *et al.* (1997 und 1999) sollte es damit möglich sein, die Proteine bei einem Gradienten von 30 % 2-Propanol zu eluieren und von den anderen Proteinen des PS-II-Proteinkomplexes zu trennen. Dieses konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Über die durchgeführten Auftrennungsversuche, sowohl mit in der Literatur beschriebenen C18- wie auch C4-Säulenmaterialien und verschiedenen Gradienten der mobilen Phase, konnte keine Auftrennung der PS-II-Proteine erzielt werden (s. Abschn. 2.5.1 und 3.3.3). Die Proteine wurden zwar an die stationäre Phase der Säule gebunden, konnten jedoch nicht wieder von ihr eluiert werden.

Von den zahlreichen chromatographischen Protein-Aufreinigungstechniken wurde aufgrund dieser Entwicklung das Trennverfahren nach Sharma *et al.* (1997a) als am besten geeignet für die Isolation eines salz- und detergensfreien D1-Proteins betrachtet.

Anhand der Ergebnisse (s. Abschn. 3.3.1) zeigte sich, dass das D1-Protein über diese Methode reproduzierbar aufgereinigt werden konnte. Die D1-Proteine konnten dabei reproduzierbar in einem 1-Propanol-Konzentrationsbereich von 41-75 % eluiert werden. Gleichzeitig konnte über die SPR-Bindungsexperimente mit dem Simazinderivat-Chip nachgewiesen werden, dass die Bindefähigkeit zu PS-II-Herbiziden durch diese Methode erhalten geblieben war (s. Abschn. 3.4.5). Auch Sharma *et al.* (1997a) hatten nachgewiesen, dass sie das D1-Protein ohne Präzipitation an die Säule im nativen Zustand eluieren konnten. In dieser Arbeit konnte, wie schon bei Sharma *et al.* (1997a) beschrieben, mit dieser Methode nur eine teilweise Separation zwischen dem D1- und dem D2-Protein erreicht werden (s. Abschn. 3.3.1). Eine vollständige Trennung der beiden Proteine ist aufgrund der beinahe gleichen Größe, des fast gleichen isoelektrischen Punktes und der sehr ähnlichen Ladung dieser im PS-II-Proteinkomplex eng miteinander assoziierten Proteine kaum möglich. Sharma *et al.* (1997a) konnten schon vorher zeigen, dass diese beiden Proteine über andere säulenchromatographische Verfahren, wie z. B. die Gelpermeationschromatographie (ein Ausschlusschromatographieverfahren), die Ionenaustauscherchromatographie oder die Gelfiltration, nicht nativ voneinander getrennt werden konnten. Für die Gelfiltration war z. B. die Verwendung des denaturierenden Detergens SDS notwendig (Takahashi *et al.*, 1988). Bei einer modifizierten Gelfiltrationsmethode ohne die Verwendung von Detergenzien wurde die Ausbeute an Protein stark herabgesetzt (Chapman *et al.*, 1991). Damit konnten die Ergebnisse von Sharma *et al.* (1997a) bestätigt werden, dass über die hier verwendete Methode der Umkehrphasenchromatographie in einem einzelnen chromatographischen Schritt diese sehr hydrophoben, integralen Membranproteine des PS II in einem salz- und detergensfreien Zustand effektiv isoliert werden können. Die Verwendung eines Systems, bei dem die Proteine salz- und detergensfrei aufgereinigt werden können, war in dieser Arbeit von großer Bedeutung für die weitere Verwendung des D1-Proteins als biologischer Einheit im Biosensor, da die Salze und Detergenzien dort für die Immobilisierung des Proteins an die Chipoberfläche störend gewesen wären. Zusätzlich wäre eine salz- oder detergenzienhaltige Isolation des D1-Proteins nicht mit der danach benötigten Konzentrierungsmethode über die sehr schonende Lyophilisation kompatibel gewesen (s. Abschn. 2.9). Hier wäre es bei der späteren Resuspendierung zu einer Konzentrierung der Salze und Detergenzien gekommen, die das D1-Protein dann hätten denaturieren können.

Die Konzentrierung des D1-Proteins war notwendig, um genügend große Mengen des Proteins für die spätere Immobilisierung an den Biosensorchip zu gewinnen. Die über die FPLC aufgereinigte Menge an D1-Protein war ohne Konzentrierung nicht ausreichend, um

die für den biosensorischen Einsatz benötigten Quantitäten zu erhalten, da zur besseren Auflösung mit einer analytischen und nicht mit einer präparativen Säule gearbeitet wurde (s. Abschn. 2.5 und 2.16.5). Für die Immobilisierung der Proteine an der Chipoberfläche wird eine Proteinkonzentration von ca. 50 µg/ml benötigt (s. Abschn. 2.16.5), diese konnte ohne Konzentrierung nicht erreicht werden. Die Lyophilisation wurde in dieser Arbeit anderen Methoden zur Konzentrierung von Proteinen vorgezogen. Die hier durchgeführte Lyophilisation gilt als besonders schonend zur Bewahrung der Nativität von Proteinen; in der eigenen Arbeitsgruppe am IMBIO (Prof. Schnabl) konnte eine Haltbarmachung von Thylakoidmembranen über mehrere Jahre ohne merkliche Aktivitätsverluste gezeigt werden (unveröffentlichte Daten). In dieser Arbeit konnte die Bewahrung der Funktionalität nach der Lyophilisation auch für das D1-Protein nachgewiesen werden (s. Abschn. 3.4.5 und 3.6), so dass diese Methode der Vakuumkonzentration (s. Abschn. 2.10.1), bei der die Proben über die Zeit der Zentrifugation aufgrund der Rotation systembedingt erhitzt werden, vorgezogen wurde. Piletskaya *et al.* (1999) konnten zeigen, dass von ihnen aufgereinigtes und lyophilisiertes D1-Protein bei einer Lagerung von +5 °C über einen Zeitraum von 2 Jahren stabil und für den Gebrauch in einem ELISA-Test zum Nachweis von Herbiziden nutzbar war.

Die in dieser Arbeit gefundene breite Koelution des D1-Proteins mit dem D2-Protein über einen Bereich von 41-75 % 1-Propanol je nach FPLC-Lauf (s. Abschn. 3.3.1, 3.3.2 und 3.4.5) kann eventuell über die Heterogenität des Proteins erklärt werden. Auch Sharma *et al.* (1997a) konnten eine breite Koelution des D1- und D2-Proteins in einem Konzentrationsbereich von 51-66 % beobachten. Sie fanden heraus, dass dieses Elutionsprofil nicht ausschließlich durch die starke Hydrophobizität der Proteine verursacht wurde, sondern auf zusätzliche Faktoren wie die Heterogenität der Proteine zurückzuführen ist. Diese heterogenen Formen der Proteine konnten sie über die Komplexität der Electrospray-Ionisation-Massenspektren (ESI-Massenspektren) von D1- und D2-Proteinen nachweisen, die sie verschiedenen Ladungszuständen der Proteine zuordnen konnten. Über Cyanogen-Bromid- und Trypsin-Verdau, verbunden mit MS-Analysen, konnten sie Oxidationen und Phosphorylierungen als Quelle für die beobachtete strukturelle Diversität der Proteine identifizieren (Sharma *et al.*, 1997b). Trotz dieser Heterogenität und des breiten Elutionsbereiches konnte die Elution des D1-Proteins in dieser Arbeit immer im Chromatogramm zugeordnet werden. Das typische Chromatogramm der Auftrennung der PS-II-Proteinkomplex-Extrakte zeigte stets im Bereich zwischen 41-75 % 1-Propanol einen breiten Doppelp- oder Multippeak, in dem das D1- und das D2-Protein koeluiert werden

konnten, wobei in dem vorderen Bereich des Peaks die höchsten Konzentrationen an D2-Protein eluierten. Abbildung 4.1 zeigt den Vergleich der Chromatogramme von vier verschiedenen FPLC-Läufen ein und desselben PS-II-Proteinkomplexes (PS II 53 BL) bei gleicher aufgetragener Proteinkonzentration. Hier kann man deutlich die unterschiedlich hohe Absorption bei den verschiedenen Läufen erkennen, was auf unterschiedlich hohe Mengen an aufgereinigtem D1- und D2-Protein in dem Doppelpack schließen lässt. So zeigen zwei der Chromatogramme eine Absorption von ca. 0,075-0,110 AU, während die beiden anderen nur eine Absorption von ca. 0,005-0,010 AU aufweisen.

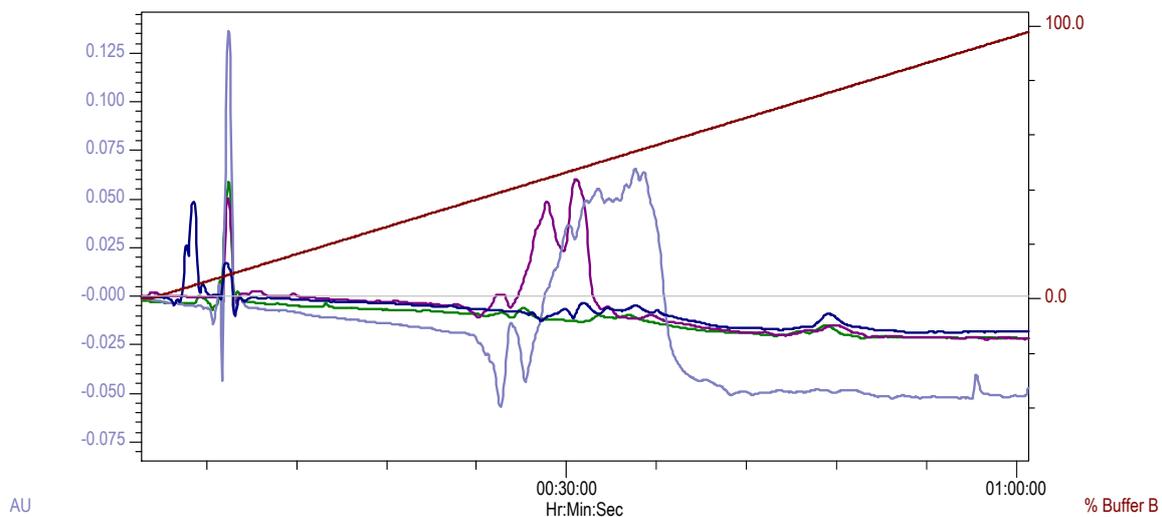


Abb. 4.1: Vergleich der Chromatogramme der Auftrennungen des PS-II-Proteinkomplexes PS II 53 BL von *Vicia faba* mit einer RP-C18-Säule (Grace Vydac, Hesperia, USA); Gradient von 5 % Essigsäure zu 1-Propanol, nach Sharma *et al.* (1997a). Y-Achse rechts: Gradient in % 1-Propanol, y-Achse links: Absorption (AU) bei 254 nm, x-Achse: Zeit in h:min:s. Grüne Linie = FPLC-Lauf für das SDS-Polyacrylamidgel, hellblaue Linie = FPLC-Lauf für den Anti-D1-AK-Chip, blaue Linie = FPLC-Lauf für den Western-Blot, lila Linie = FPLC-Lauf für den Simazinderivat-Chip, dunkelbraune Linie = Gradient in % 1-Propanol.

Aufgrund der relativ geringen aufgereinigten Mengen an D1-Protein konnte nicht ein und dieselbe chromatographische Aufreinigung für die Untersuchungen mit den vier verschiedenen Nachweismethoden dienen. Daher musste für jede Nachweismethode ein individueller FPLC-Lauf verwendet werden, wodurch es zu den beobachteten Abweichungen in der Retentionszeit des D1-Proteins kommen kann (s. Abschn. 3.3.1, 3.3.2 und 3.4.5).

Über den breiten Elutionsbereich und die nicht vollständig reproduzierbaren FPLC-Läufe desselben Proteinkomplex-Extraktes können auch die leicht verschobenen Nachweise von D1-Protein durch die verschiedenen Methoden der SDS-PAGE, des Western-Blottings, der SPR mit Anti-D1-AK-Chip und der SPR mit Simazinderivat-Chip erklärt werden (s. Abschn. 3.3.1, 3.3.2, 3.4.5 und Tab. 4.1).

PS-II-Protein-komplex-Extrakt	Säulenmaterial	SDS-PAGE	Western-Blotting	SPR Anti-D1-AK-Chip	SPR Simazinderivat-Chip
		Fraktion/ 1-Propanol	Fraktion/ 1-Propanol	Fraktion/ 1-Propanol	Fraktion/ 1-Propanol
PS II 53 BL	C18	34-43 52-68 % Dimere: 33-47 50-75 %	35-43 53-68 % Dimere: 34-44 52-70 %		28-37 42-58 %
PS II 54 KL	C18	29-40 43-63 %	30-42 45-67 %		32 + 36 48-50 % + 55-57 %
PS II 55 E1	C18	30-44 45-70 %	29-44 43-70 %		31 + 33 47-48 % + 50-52 %
PS II 48 B	C18			21-23 48-55 %	
PS II 49 BL	C18			18 + 19 43-45 %	
PS II 10 B	C4			32-35 41-48 %	
PS II 12 E1	C4			36 + 37 47-51 %	
PS II 19 E2	C4			39-42 53-60 %	

Tab. 4.1: Übersicht über die mit den Methoden der SDS-PAGE, des Western-Blottings, der SPR mit Anti-D1-AK-Chip und der SPR mit Simazinderivat-Chip nachgewiesenen Elutionsbereiche von D1-Protein in % 1-Propanol bzw. Fraktionsnummer. PS II = PS-II-Proteinkomplex-Extrakt, Zahl = Nummer des Extraktes, B = *Vicia faba*, E1 = *Pisum sativum* var. *Feltham first*, E2 = *Pisum sativum* var. *Maiperle*, K = *Lactuca sativa*. L = Anzucht mit künstlicher Zusatzbelichtung, ohne L = Anzucht ohne künstliche Zusatzbelichtung (s. Anhang 7.1).

So konnte z. B. bei den chromatographischen Auftrennungen des PS-II-Proteinkomplex-Extraktes PS II 53 BL aus *Vicia faba* das D1-Protein über SDS-PAGE und Western-Blotting im übereinstimmenden Elutionsbereich von 50-75 % bzw. 52-70 % 1-Propanol detektiert werden (s. Tab. 4.1). Über den SPR-Simazinderivat-Chip konnte dagegen bindefähiges D1-Protein bei einem 1-Propanol-Prozentsatz von 42-58 % nachgewiesen werden (s. Tab. 4.1). Betrachtet man nun in Abbildung 4.1 die Chromatogramme für die verschiedenen FPLC-Läufe dieses PS-II-Proteinkomplex-Extraktes, so sieht man, dass bei dem Lauf für den Simazinderivat-Chip (lila) der Doppelpack sehr viel eher erscheint. Damit wird verständlich, warum die Nachweise des D1-Proteins nicht bei allen Methoden in demselben Elutionsbereich erfolgt sind.

Bei den chromatographischen Auftrennungen des PS-II-Proteinkomplex-Extraktes PS II 54 KL aus *Lactuca sativa* wurde mit der SDS-PAGE und dem Western-Blotting D1-Protein im homologen Elutionsbereich von 43-63 % bzw. 45-67 % detektiert (s. Tab 4.1). Hier stimmte der qualitative Nachweis des D1-Proteins über den SPR-Simazinderivat-Chip mit diesem Bereich überein (s. Tab 4.1). Eine Detektion von bindefähigem D1-Protein erfolgte mit dem

Simazinderivat-Chip im Bereich von 48-50 % und 55-57 % 1-Propanol. Der bei überwiegend übereinstimmenden Elutionszeiten erbrachte Nachweis des D1-Proteins über die verschiedenen Methoden deckt sich mit den FPLC-Chromatogrammen der verschiedenen Läufe des PS-II-Proteinkomplex-Extraktes PS II 54 KL (s. Abb. 4.2). Es zeigten sich sehr ähnliche Elutionsprofile der Chromatogramme (s. Abb. 4.2). Im Unterschied zu den bei *Vicia faba* und *Pisum sativum* im Elutionsbereich von D1 beobachteten Doppelpicks war bei *Lactuca sativa* immer nur eine Multipeakauftrennung zu finden.

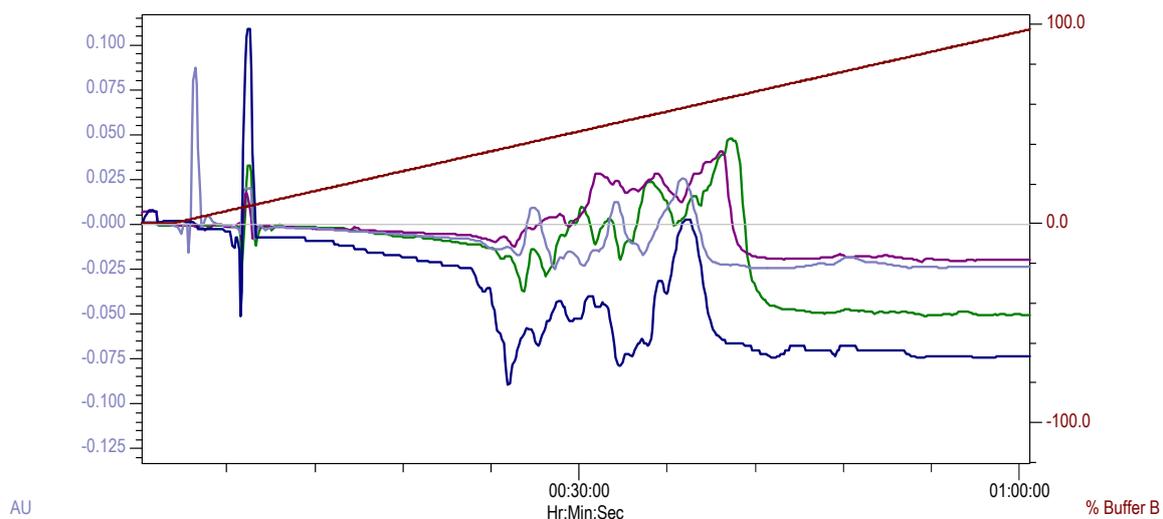


Abb. 4.2: Vergleich der Chromatogramme der Auftrennungen des PS-II-Proteinkomplexes PS II 54 KL von *Lactuca sativa* mit einer RP-C18-Säule (Grace Vydac, Hesperia, USA); Gradient von 5 % Essigsäure zu 1-Propanol, nach Sharma *et al.* (1997a). Y-Achse rechts: Gradient in % 1-Propanol, y-Achse links: Absorption (AU) bei 254 nm, x-Achse: Zeit in h:min:s. Grüne Linie = FPLC-Lauf für den Simazinderivat-Chip, hellblaue Linie = FPLC-Lauf für den Western-Blot, lila Linie = FPLC-Lauf für das SDS-Polyacrylamidgel, blaue Linie = FPLC-Lauf für den Anti-D1-AK-Chip, dunkelbraune Linie = Gradient in % 1-Propanol.

Auch bei den chromatographischen Auftrennungen des PS-II-Proteinkomplex-Extraktes PS II 55 E1 aus *Pisum sativum* konnte der Nachweis der Bindefähigkeit über den Simazinderivat-Chip, über die Nachweise in der SDS-PAGE und im Western-Blotting bestätigt werden. Bei 47-48 % und 50-52 % 1-Propanol konnte eine Bindung von D1-Protein an den Simazinderivat-Chip detektiert werden, in einem Elutionsbereich also, der innerhalb des über SDS-PAGE und Western-Blotting nachgewiesenen Bereichs von 43-70 % 1-Propanol liegt.

Bei den ebenfalls in den Fraktionen von 41-70 % 1-Propanol zu findenden Proteinen mit einem Molekulargewicht von ca. 9 und 21 kDa (s. Abschn. 3.3.1) könnte es sich eventuell um D1-Abbaufragmente handeln (Greenberg *et al.*, 1987; Canovas und Barber, 1993; Kanervo *et al.*, 1998; Wiklund *et al.*, 2001; Agrisera, 2004). Schon geringe Temperaturerhöhungen über 4 °C sowie zu starke Belichtung der Proteine während der Isolation oder Lagerung können zur Zerstörung der Proteine führen und damit auch zum Abbau des aufgereinigten D1-Proteins (Chapman *et al.*, 1989). Wie in der Literatur beschrieben (Greenberg *et al.*, 1987; Canovas

und Barber, 1993; Kanervo *et al.*, 1998; Wiklund *et al.*, 2001), wird durch Proteasen das D1-Protein in ein ca. 23 und ein ca. 10 kDa großes Fragment gespalten (s. Abschn. 4.1.4). Die hier zu findenden Proteinbanden könnten mit diesen übereinstimmen, was erklären würde, warum sie in den gleichen Fraktionen wie die intakten D1-Proteine eluiert wurden. Dieser Abbau könnte eventuell in Zukunft durch die Verwendung einer modifizierten Isolationsmethode mit Proteaseinhibitoren verhindert werden.

Eine Variation des Gradienten der mobilen Phase mit verschiedenen isokratischen Schritten (s. Abschn. 2.5) führte zu keiner Verbesserung der Auftrennungsleistung. Die bestmögliche Auftrennung wurde mit einem linearen Gradienten von 0 auf 100 % 1-Propanol über 60 min bei einer Flussrate von 0,5 ml/min erzielt. Damit konnten die Untersuchungen von Sharma *et al.* (1997a) bestätigt werden.

Im Unterschied zu Sharma *et al.* (1997a) konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch dann noch Herbizid-bindefähiges D1-Protein isoliert werden konnte, wenn keine Dialyse des PS-II-Proteinkomplex-Extraktes gegen 5 % Essigsäure vor der chromatographischen Aufreinigung stattfand (s. Abschn. 3.4.5). Auch aus den nicht dialysierten PS-II-Proteinkomplexen konnte bindefähiges D1-Protein mit dieser FPLC-Methode aufgereinigt werden (s. Abschn. 3.4.5). Sharma *et al.* (1997a) beschrieben die Dialyse als Mittel, um die aufgereinigten PS-II-Proteinkomplexe von den zuvor verwendeten Salzen und Detergenzien zu befreien. Da bei der hier durchgeführten PS-II-Proteinkomplex-Isolation nicht Detergenzien, sondern Butanol verwendet wurde (s. Abschn. 2.4), wurde der Dialyseschritt an dieser Stelle nicht zwingend benötigt. Nach der Butanolextraktion lagen die PS-II-Proteinkomplexe in einer wässrigen Phase vor, in der nur flüchtige Reste an Butanol vorhanden blieben. Durch die Lyophilisation der PS-II-Proteinkomplexe kam es zu der Entfernung dieser letzten Butanolreste, so dass hier keine Dialyse zwingend notwendig war. Das Dialyseverfahren wurde trotzdem parallel untersucht, da vermutet wurde, dass hierdurch ein schonenderer Austausch des wässrigen PS-II-Proteinkomplex-Extraktes gegen die 5 % Essigsäure gewährleistet würde. Es konnte hier jedoch kein wesentlicher Vorteil für die Verwendung der Dialyse im Vergleich zur Lyophilisation gezeigt werden.

In dieser Arbeit wurde, soweit aus der Literatur ersichtlich, erstmalig mit einem Anti-D1-Antikörper isoliertes D1-Protein über die Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Methodik nachgewiesen.

Bisher wurde der Nachweis von D1-Protein über Antikörper nur über die Methode des Western-Blotting erbracht (Hankamer *et al.*, 1997a; Komenda *et al.*, 2002). Die Oberflächen-Plasmon-Resonanz hat gegenüber den herkömmlichen Antikörper-Nachweis-Methoden wie

z. B. dem Western-Blotting und dem ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) viele Vorteile. Im Vergleich zum Western-Blotting und ELISA ist sie sehr viel weniger zeit- und arbeitsaufwendig. Das hier durchgeführte Western-Blotting dauerte vom Blotten der Proteine auf die Membran bis zum Nachweis des Proteins auf dem Film ca. eineinhalb Tage und ist sehr arbeitsintensiv. Die ELISA-Methode ist ebenfalls sehr zeit- und arbeitsaufwendig. Bei der markierungsfreien Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Methode, die in Echtzeit durchgeführt wird, kann der Nachweis dagegen innerhalb von weniger als drei Minuten erbracht werden. Ein weiterer Vorteil des Biosensors gegenüber von ELISA-Tests und Western-Blotting stellt die Wiederverwendbarkeit und Regeneration des Biosensors dar. Da die D1-Proteine immer wieder mit Laufpuffer frei gewaschen werden können (s. Abschn. 3.6), kann die Chipoberfläche mehrfach verwendet werden. Nachteil der SPR-Technologie ist allerdings der hohe Preis der Messgeräte.

Bei den Untersuchungen über die Methode der Oberflächen-Plasmon-Resonanz mit einem Anti-D1-Antikörper-Chip konnte in dieser Arbeit nicht immer D1-Protein detektiert werden. Von 21 getesteten FPLC-Aufreinigungen von PS-II-Proteinkomplexen konnte in fünf D1-Protein über den Anti-D1-Antikörper-Chip mit der SPR-Methode nachgewiesen werden (s. Abschn. 3.3.2 und Anhang 7.2). Dieses kann über die Eigenschaften des Anti-D1-Antikörpers erklärt werden. Bei dem einzigen Antikörper, der zu kaufen ist (Agrisera, Vännäs, S), handelt es sich um einen polyklonalen Peptidantikörper. Das Peptidtarget, gegen das dieser Antikörper hergestellt wurde, stammt aus einer konservierten Region in einem luminalen Loop des D1-Proteins nahe dem C-Terminus (luminaler Loop zwischen den Transmembranhelices III und IV, s. Abb. 1.2) (Agrisera, 2004). Da der Antikörper aufgrund dieser Herstellung neben dem vollständigen D1-Protein nur das 10- oder 24-kDa-C-terminale-Abbaufragment des D1-Proteins erkennt (Agrisera, 2004), kann es sein, dass es durch Lichteinwirkung oder Temperatureinfluss zu einem Abbau des D1-Proteins gekommen ist (Chapman *et al.*, 1989) und der Antikörper das Abbaufragment nicht mehr nachweisen konnte. Zusätzlich ist es möglich, dass das lyophilisierte Protein beim Wiederlösen in dem HBS-EP-Puffer (s. Abschn. 2.16.3.3) nicht immer vollständig gelöst werden konnte und an den Wänden der Reagenzgefäße haften blieb. Diese Beobachtung beschreiben auch Sharma *et al.* (1997a) für das D1-Protein. Im Gegensatz zu den Anti-D1-AK-Chip-Messungen wurde das lyophilisierte D1-Protein für die Untersuchungen über SDS-PAGE und Western-Blotting in SDS solubilisiert, wodurch hier ein solches Problem wahrscheinlich verhindert werden konnte.

Mit dem D1-Antikörper-SPR-Nachweis konnten sehr viel geringere Mengen an D1-Protein detektiert werden, als theoretisch nach Formel 3.1 (s. Abschn. 3.4.2) möglich gewesen wäre. Maximal hätten nach Formel 3.1 bei einem Immobilisierungslevel des Anti-D1-AK von 13.191 RU ca. 3.341 RU D1-Protein identifiziert werden können. Mit den maximal detektierten 159 RU in Fraktion 22 sind damit nur ca. 5 % der maximal möglichen Bindungskapazität an D1-Proteinen detektiert worden. Dieser relativ geringe Nachweis des D1-Proteins lässt sich wahrscheinlich durch die Verwendung eines polyklonalen Antikörpers erklären. Polyklonale Antikörper enthalten eine große Vielfalt verschiedener Antikörper mit unterschiedlicher Epitopspezifität und -affinität (Lottspeich und Zorbas, 1998). Bei polyklonalen Antikörpern ist es daher möglich, dass nur ca. 10 % der Antikörperfraktion das spezifische Antigen detektieren kann (Lottspeich und Zorbas, 1998). Dieses Problem kommt beim Western-Blotting nicht so zum Tragen, da hier die Antikörper frei vorliegen und nur die bindefähigen Antikörper an die Proteine auf der Blotting-Membran binden, die restlichen werden später abgewaschen. Bei der SPR-Methode sind entgegengesetzt dazu alle Antikörper immobilisiert, bindefähige wie nicht bindefähige. Dieses Problem könnte durch die Verwendung von monoklonalen Antikörpern eventuell gelöst werden, die derzeit jedoch nicht zu kaufen sind und für die es keine Möglichkeit gab, sie selber herzustellen. Dieser Ansatz wäre es daher wert, in Zukunft weiter verfolgt zu werden. Der Nachteil eines monoklonalen Antikörpers könnte jedoch sein, dass er leicht modifizierte D1-Proteine nicht detektiert, da er nur gegen ein spezielles Epitop des Antigens gerichtet ist, wohingegen der hier verwendete Peptidantikörper auch noch C- oder N-terminal modifizierte D1-Proteine sowie C-terminale Abbauprodukte identifizieren kann (Agrisera, 2004).

Zusätzlich kommt es durch die kovalente Aminkopplung zu einer zufälligen Orientierung der Antikörper an der Chipoberfläche (s. Abschn. 2.16.3.1), da es sich bei dieser Methode um keine gerichtete Immobilisierung handelt. Daher sind durch diese Kopplungsmethode bei einem nicht weiter zu bestimmenden Anteil der Antikörper die Paratope für das Antigen nicht mehr zugänglich. Dieses Problem könnte durch eine gerichtete Immobilisierungsmethode zukünftig umgangen werden, bei der zuerst ein Antikörper gegen die konstante Region des Anti-D1-Antikörpers kovalent an die Chipoberfläche gekoppelt wird und anschließend der Anti-D1-Antikörper über die Antikörper-Antigen-Wechselwirkung gebunden wird. So kann eine gerichtete jedoch nicht-kovalente Bindung des Anti-D1-Antikörpers an die Chipoberfläche erreicht werden. Dies hat jedoch wiederum den Nachteil, dass diese Oberflächen sehr viel instabiler sind als die kovalent gekoppelten, und die Anti-D1-Antikörper von der Chipoberfläche abgewaschen werden. Daher kann es in diesem Fall zu

einem hohen Verlust an Antikörpern kommen, damit verbunden zu einer hohen Drift während der Messung, welche die Interpretation der Messergebnisse erschwert bzw. verhindert.

Da der Antikörper gegen eine Peptidregion am luminalen Loop der C-terminalen Region gerichtet war, konnte so nur bedingt eine Aussage darüber gemacht werden, ob noch ein D1-Protein mit einer erhaltenen Q_B-Bindenische vorlag (s. Abschn. 1.2 und 1.3). Daher wurde ein Antikörper speziell gegen eine 20 Aminosäuren lange Region aus der Q_B-Bindenische in Auftrag gegeben. Dieser konnte nicht mehr in dieser Arbeit getestet werden, da er nicht rechtzeitig fertiggestellt wurde. In Zukunft wären Versuche mit diesem speziell produzierten Antikörper sehr viel versprechend, da damit getestet werden könnte, ob das aufgereinigte D1-Protein noch seine Bindenische besitzt oder ob es sich nur um ein Abbaufragment handelt, das mit dem kommerziell erhältlichen Anti-D1-Antikörper identifizierbar ist, jedoch keine Q_B-Bindenische mehr besitzt. Da ferner eine Affinitätsaufreinigung für diesen Antikörper vorgesehen war, könnte damit auch die Menge an bindefähigen Antikörpern gegen das Antigen erhöht werden. Auf diese Weise wäre es dann möglich, einen höheren Prozentsatz an bindefähigen Antikörpern an der SPR-Chipoberfläche zu immobilisieren; damit könnte dann eventuell auch ein höherer Nachweis von D1-Protein erzielt werden.

4.2.1 Vergleich ausgewählter Pflanzenspezies

Auch im D1-Protein-Aufreinigungsschritt über die Reversed phase Fast protein liquid chromatography (RP-FPLC) konnten deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen untersuchten Pflanzenspezies gefunden werden (s. Abschn. 3.3.1, 3.3.2 und 3.4.5). Zwar konnte bei allen Spezies das D1-Protein in dem sehr breiten Bereich von 41-75 % 1-Propanol eluiert werden, die nachgewiesenen Mengen an D1-Protein waren jedoch je nach Pflanzenspezies sehr unterschiedlich hoch. Auch hier zeigte sich wieder *Vicia faba* als die Spezies mit den höchsten D1-Protein-Gehalten (s. Abschn. 3.3.1). Dabei ist zu beachten, dass ein direkter Vergleich der Proben auf einem SDS-Polyacrylamidgel bzw. einem Western-Blot aufgrund der Probenanzahl nicht möglich war und daher mehrere SDS-Polyacrylamidgelle bzw. Western-Blots soweit wie möglich parallel unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, um die Versuchsbedingungen so konstant wie möglich zu halten.

Als besonders herausragendes Ergebnis konnte gezeigt werden, dass selbst nach der chromatographischen Auftrennung der PS-II-Proteinkomplexe die D1/D2-Dimere bei *Vicia faba* erhalten blieben. Übereinstimmend mit den aus den PS-II-Proteinkomplex-Aufreinigungen erhaltenen Ergebnissen wurden auch in den chromatographischen Aufreinigungen nur bei der Pflanzenspezies *Vicia faba* D1/D2-Dimere gefunden (s. Abschn.

3.3.1). Aufgrund dieser Ergebnisse sowie wegen der höchsten Ausbeute an D1-Protein wurde das D1-Protein von *Vicia faba* für die weitere Verwendung als biologische Einheit im SPR-Biosensor ausgewählt. Die Bewahrung von D1/D2-Dimeren wurde als Grund für die besser erhaltene Binfähigkeit zu PS-II-Herbiziden interpretiert (s. Abschn. 4.3).

Diese Bewahrung der Dimere bei *Vicia faba* bestätigte den schonenden Ablauf und die gute Eignung der hier verwendeten chromatographischen Aufreinigungsmethode (s. Abschn. 2.5.1 und 3.3.1). Durch die Umkehrphasenchromatographie kam es hier zu keiner Trennung der zuvor in der Butanolextraktion ebenfalls erhalten gebliebenen D1/D2-Dimere. Damit kann aufgrund dieser Ergebnisse und unter Berücksichtigung der erhalten gebliebenen Binfähigkeit zu PS-II-Herbiziden (s. Abschn. 3.4.5 und 3.6) davon ausgegangen werden, dass es durch diese chromatographische Aufreinigung zu keiner Denaturierung der Proteine kam, wie dies auch schon bei Sharma *et al.* (1997a) beschrieben wurde.

Auch hier kann der Zusammenhalt des D1- und D2-Proteins wahrscheinlich über die Aminosäurezusammensetzung der beiden Proteine erklärt werden. Wie bereits unter Abschnitt 1.2 und 4 (erste Seite) erläutert, unterscheiden sich die Aminosäuresequenzen des D1-Proteins verschiedener Pflanzenspezies (Svensson *et al.*, 1991; Jansson u. Mäenpää, 1997; Oettmeier, 1999).

Da das D2-Protein eng mit dem D1-Protein im Photosystem-II-Proteinkomplex assoziiert ist, wird ein Einfluss des D2-Proteins auf die Konformation der Herbizidbindenische des D1-Proteins angenommen (Trebst, 1986). So sind z. B. die konservierten Histidine His215 und His272 des D1-Proteins an der Bindung des Eisen-Moleküls zusammen mit zwei Histidinen des D2-Proteins beteiligt. Dabei ist zu beachten, dass die Q_B-Bindenische des D1-Proteins etwa im Aminosäurebereich von 211 bis 275 identifiziert wurde (s. Abschn. 1.3) (Trebst, 1995). Damit hat das D2-Protein über die Bindung an das Eisen-Molekül einen Einfluss auf die Konformation der Q_B-Bindenische des D1-Proteins. Nach einem Faltungsmodell von Trebst (1991) sind die Aminosäuren Tyrosin 237 und Arginin 238 in der Q_B-Bindenische des D1-Proteins in Kontakt mit dem Arginin 234 des D2-Proteins. Diese enge Assoziation lässt darauf schließen, dass ein D1-Protein mit einer im ursprünglichen Zustand erhalten gebliebenen Q_B-Bindenische am ehesten bei D1/D2-Dimeren gewonnen werden kann.

Über den engen Kontakt zwischen dem D1- und D2-Protein kann wahrscheinlich auch das Auftreten der D1/D2-Dimere nur bei der Pflanzenspezies *Vicia faba* erklärt werden. *Vicia faba* zeigt in den Aminosäuresequenzen des D1-Proteins wie des D2-Proteins Unterschiede zu *Pisum sativum* und *Lactuca sativa* (Svensson *et al.*, 1991; P13910 PSBA_VICFA Swiss Prot, 2006; P06585 PSBA_PEA Swiss Prot, 2006; P69557 PSBA_LACSA Swiss Prot, 2006). Im

Vergleich zu *Pisum sativum* sind bei *Vicia faba* acht Aminosäuren im D1-Protein ausgetauscht (Svensson *et al.*, 1991). Über diese unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung des D1-Proteins von *Vicia faba* kommt es wahrscheinlich zu einer höheren Vernetzung zwischen dem D1- und dem D2-Protein, da sich die Polypeptidketten der Proteine abhängig von der Aminosäuresequenz in typische, genau festgelegte Konformationen falten (Lehninger *et al.*, 1994). Dieses könnte eine Erklärung dafür sein, warum diese beiden Proteine nur partiell durch die hier verwendete schonende Aufreinigungsmethode voneinander getrennt werden konnten.

4.3 Entwicklung einer SPR-Methode zum qualitativen, über einen Simazinderivat-Chip geführten Nachweis der Herbizid-Bindfähigkeit des aufgereinigten D1-Proteins

Da der Antikörper das D1-Protein im nativen wie im denaturierten Zustand erkennt (Agrisera, 2004), können mit den D1-Antikörper-Nachweisen des Western-Blottings und des Anti-D1-Antikörper-SPR-Chips keine Aussage über die funktionelle Bindfähigkeit des D1-Proteins zu Herbiziden getroffen werden. Daher wurde eine Methode zum Nachweis der Bindfähigkeit des D1-Proteins an ein PS-II-Herbizid erarbeitet.

Dazu wurde in dieser Arbeit erstmals ein mit 6-{[4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl]amino}-hexansäure (Simazinderivat) gekoppelter SPR-C1-Chip entwickelt. Neuartig war darüber hinaus die Entwicklung einer SPR-Nachweismethode für D1-Protein über die Bindung an die auf einem SPR-Chip immobilisierten Herbizidderivate. Im Besonderen wurde auch der qualitative Nachweis von D1-Protein mit erhaltener Q_B-Bindenische über diese SPR-Methode hier zum ersten Mal beschrieben.

Für die Immobilisierung des PS-II-Herbizides Simazin an einen SPR-Chip über die Methode der Oberflächenthioalkopplung musste dieses modifiziert werden (s. Abschn 2.15. und 2.16.4.1). Dazu wurde ein Hexansäure-Spacer an das Simazin gekoppelt, damit zum einen dieses später an der Chipoberfläche leichter für das sehr viel größere D1-Protein zugänglich und damit zum anderen eine COOH-Gruppe in das Molekül eingefügt wurde. Dies war notwendig, um eine Kopplung des Simazins an den Chip zu ermöglichen, da das freie Simazin keine Gruppen besitzt, mit denen es über eine kovalente Kopplung an einen Chip immobilisiert werden kann. Kleine Moleküle verfügen generell über weniger funktionelle Gruppen für die Kopplung an eine Biosensor-Oberfläche. In vielen Fällen müssen sie zuerst modifiziert werden, um eine Linkerfunktion, etwa eine Carboxylgruppe, einzufügen (Adamczyk *et al.*, 1997 und 1998; Schlecht *et al.*, 2002). Da aus der Literatur bekannt ist, dass die Q_B-Bindungsnische tief im D1-Protein lokalisiert ist, ca. 10 C-Atome von der

Oberfläche entfernt (Jockers *et al.*, 1993), wurde eine bessere Zugänglichkeit für ein mit einem Hexansäure-Spacer versehenes Simazin vermutet. So konnten Piletskaya *et al.* (1999) zeigen, dass ein Metribuzin-HRP-Konjugat, modifiziert mit einem Hexamethylen-Spacer, in einem ELISA-Test eine bessere Bindungsaffinität zu D1-Protein zeigte als das unmodifizierte Metribuzin-HRP-Konjugat. In dieser Arbeit war es über die Einführung einer COOH-Gruppe möglich, das Simazin über eine Oberflächenthioalkopplung zu immobilisieren, bei der aufgrund der Kopplungsmethode, anders als bei der allgemein verwendeten Aminkopplung, noch ein weiterer Spacer in die Kette eingefügt und das Molekül so noch freier zugänglich wird (s. Abschn. 2.16.4.1). Die verwendete Thioalkopplungsmethode ermöglicht es darüber hinaus, auch noch den Liganden über die Reduktion mit Dithioerythritol (DTE) wieder von der Chipoberfläche zu entfernen. Damit liefert diese Kopplungsmethode mehrere entscheidende Vorteile gegenüber der üblicherweise verwendeten Aminkopplungsmethode. Die Aminkopplung stellt mit über 50 % aller im Jahr 1998 (Myszka, 1999b) und mit ca. 45 % der im Jahr 2003 verwandten Kopplungsmethoden (Rich und Myszka, 2005) die in der Literatur am häufigsten beschriebene Immobilisierungsmethode (Rich und Myszka, 2005).

Bei der Überprüfung der Immobilisierung des Simazinderivates über den Anti-Triazin-Antikörper konnten sowohl die Kinetik als auch die Affinität dieser Reaktion bestimmt werden. Über die Affinitätsberechnung wurde dabei eine Dissoziations-Gleichgewichtskonstante (K_D) von $2,76 \times 10^{-7}$ M ermittelt (s. Abschn. 3.4.3.1). Schlecht *et al.* (2002) haben für zwei andere immobilisierte Herbizide, 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure und 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure, über einen Bindungsassay mit entsprechenden Antikörpern eine K_D von 3×10^{-6} M⁻¹ und 3×10^{-5} M⁻¹ bestimmt. Damit lag die in dieser Arbeit ermittelte Dissoziations-Gleichgewichtskonstante im Bereich von Affinitäten vergleichbarer Systeme. Bei einer typischen Reichweite der Dissoziations-Gleichgewichtskonstante von 1×10^{-5} bis 1×10^{-12} (Biacore Kinetic and Affinity Analysis with Biacore – Level 1, 2003) zeigte sich insgesamt jedoch eine relativ geringe Affinität des Antikörpers zu dem Simazinderivat. Diese kann eventuell über die Modifizierung des Simazins erklärt werden, wodurch der verwendete Anti-Triazin-Antikörper dieses modifizierte Simazin wahrscheinlich nicht mehr in der gleichen Weise wie das unmodifizierte Simazin erkennen konnte. Ein direkter Vergleich der Dissoziations-Konstanten mit einem ähnlichen System, bestehend aus einem immobilisierten Simazin oder einem Atrazinderivat und einem Antikörper als Bindepartner, konnte nicht gezogen werden, da dazu in der Literatur keine Untersuchungen beschrieben sind.

Für die kinetische Auswertung der Bindung konnte ein 1:1-Langmuir-Bindungsmodell angewendet werden, um die Bindung des monoklonalen Anti-Triazin-Antikörpers zu

beschreiben, da aufgrund des geringen Immobilisierungslevels des Simazinderivates die Antikörper nur die Möglichkeit hatten, mit einer ihrer zwei verfügbaren Bindestellen an das Antigen zu binden. Über die Bestimmung der Kinetik des Systems konnten sehr ähnliche Werte wie über die Affinitätsauswertung für K_A und K_D ermittelt werden. Hier wurde ein K_D von $2,58 \times 10^{-7}$ M bestimmt (s. Abschn. 3.4.3.2). Dies spricht dafür, dass das gewählte Modell zur Erklärung der Bindung geeignet ist.

Damit wurde über die Versuche mit dem Anti-Triazin-Antikörper nachgewiesen, dass das Simazinderivat auf der Sensoroberfläche immobilisiert werden konnte. Nach diesen Untersuchungen mit dem Anti-Triazin-Antikörper war auch zu erwarten, dass das D1-Protein, über die freie Zugänglichkeit zu dem Simazin über den Linker, ebenfalls an der Chipoberfläche binden kann und damit über diese Methode nachzuweisen ist.

Diese Erwartung bestätigte sich bei den D1-Protein-Aufreinigungen aller hier untersuchten Pflanzenspezies. Bei den isolierten D1-Proteinen der drei Spezies wurde eine Bindung von D1-Protein an das an die Sensorchipoberfläche immobilisierte Simazinderivat nachgewiesen (s. Abschn. 3.4.5).

Bei dem Vergleich der untersuchten Pflanzenspezies im Hinblick auf die Bindungsstärke der isolierten D1-Proteine am Simazinderivat-Chip zeigte einmal mehr *Vicia faba* die höchsten Messsignale (s. Abschn. 3.4.5). Dieser höchste Bindungsnachweis kann auch hier wahrscheinlich über die Bewahrung der D1/D2-Dimere bei den D1-Protein-Aufreinigungen von *Vicia faba* erklärt werden; durch die starke Assoziation dieser beiden Proteine zueinander kommt es wahrscheinlich zu einem besseren Erhalt der Q_B -Bindenische (s. Abschn. 4.2.1).

Aufgrund dieser Beobachtungen und aufgrund der zuvor erzielten Ergebnisse, wie dem höchsten Gesamtproteingehalt, der höchsten Vitalität, den höchsten D1-Proteingehalten in den PS-II-Proteinkomplexen und den höchsten Bindungsnachweisen am Anti-D1-Protein-AK-Chip, wurde *Vicia faba* als die unter den untersuchten Pflanzenspezies am besten geeignete für die Isolation von D1-Proteinen für biosensorische Anwendungen identifiziert. Daher wurde bei dem Einsatz des D1-Proteins im SPR-Biosensor zum Nachweis von PS-II-Herbiziden nur noch mit Isolaten von *Vicia faba* gearbeitet.

Für die sehr niedrigen SPR-Signale durch die Bindung von D1-Protein an die mit Simazinderivat modifizierte Chipoberfläche (s. Abschn. 3.4.5) können verschiedene mögliche Ursachen angeführt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war ausschließlich das Simazinderivat über eigene Synthese zugänglich. Es ist jedoch bekannt, dass das Simazin ein PS-II-Herbizid ist, das eine im Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor nachgewiesene deutlich geringere Affinität zur Q_B -Bindenische aufweist als z. B. Atrazin oder Diuron (s. Abschn.

3.4.4; Bausch-Weis *et al.*, 1994; Schnabl *et al.*, 2000; Schnabl und Trapmann, 2001). Über Fluoreszenzmessungen mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor konnte gezeigt werden, dass es durch die Modifizierung des Simazins mit der Hexansäurekette zu einer weiteren Affinitätsabnahme des Simazins gegenüber der Q_B -Bindenische kam (s. Abschn. 3.4.4.). Der photosynthetische Elektronentransport wurde durch das Simazinderivat um den Faktor 300 weniger gehemmt als durch Simazin und um den Faktor 600 weniger als durch Diuron. Damit kann wahrscheinlich das geringe Nachweissignal von D1-Protein über den Simazinderivat-Chip erklärt werden. Weiter kommt hinzu, dass durch die angewandte Kopplungsmethode (s. Abschn. 2.16.4.1) nicht genau gesteuert werden konnte, wie viel Simazinderivat und wie viel PDEA, das zur Aktivierung des Simazinderivates hinzugegeben werden musste, an der Chipoberfläche immobilisiert wurde (s. Abschn. 2.16.4.1 und 3.4.2). Aufgrund des ähnlichen Molekulargewichtes des Simazinderivates und des PDEA konnten diese auch nicht über ein Trennverfahren, wie es bei Goodrow *et al.* (1990) für ein anderes System beschrieben wird, voneinander getrennt werden, bevor das aktivierte Simazinderivat an den Chip gekoppelt wurde. Damit konnte in diesem Fall keine verlässliche maximale Bindungskapazität (R_{max}) bestimmt werden (s. Abschn. 3.4.2), da keine Aussage über die Immobilisierungsmenge an Simazinderivat durch das Sensorgramm möglich war.

So konnte z. B. bei der Flusszelle 2 über den durchgeführten Anti-Triazin-Antikörper-Nachweis eine um den Faktor 1.000 geringere maximale Bindungskapazität (R_{max}) (45,4 RU) bestimmt werden als die theoretisch berechnete (43.697 RU) (s. Abschn. 3.4.2). Diese geringe Bindungskapazität kann zum einen auf eine geringe Menge an immobilisiertem Simazinderivat und zum anderen auf eine geringe Bindungsaffinität des Antikörper zum Liganden zurückgeführt werden. Da kein spezifischer Antikörper gegen das Simazinderivat zugänglich war und damit hier nur ein Anti-Triazin-Antikörper verwendet werden konnte, der gegen unmodifizierte Triazine (Atrazin, Metribuzin und Simazin) gerichtet war, wäre es möglich, dass die Erkennung durch den Antikörper nicht in gleichem Maße wie bei einem nicht modifizierten Simazin erfolgen konnte. Durch die Modifizierung und Kopplung des Simazins kann es zu einer Veränderung des Epitops für die Bindung des Antikörpers gekommen sein, so dass dieser das Antigen nicht mehr gleich gut erkennen konnte. Hier könnte in Zukunft die Herstellung eines speziell gegen das modifizierte Simazinderivat gerichteten Antikörpers Abhilfe schaffen. Ebenso könnten auch andere Herbizidderivate an der Chipoberfläche immobilisiert werden.

Über die Verwendung eines CM5-Chips mit einem im Vergleich zum C1-Chip deutlich höheren Anteil an Bindestellen wäre es in Zukunft möglich, eine höhere Bindungskapazität

des Analyten zu erreichen. Dieser Ansatz wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht verfolgt, da auch kinetische Auswertungen der Bindung der Liganden, sowohl des Anti-Triazin-Antikörpers als auch des aufgereinigten D1-Proteins, erfolgen sollten. Für die kinetische Auswertung darf die Bindungskapazität des Analyten jedoch nicht zu hoch sein (Biacore Kinetic and Affinity Analysis with Biacore – Level 1, 2003); daher wurde hier der C1-Chip mit weniger Bindungsstellen eingesetzt. Das Immobilisierungslevel des Liganden sollte möglichst bei ca. 50-100 RU liegen (Biacore Kinetic and Affinity Analysis with Biacore – Level 1, 2003); diese Bedingung für kinetische Messungen wurde mit einer Immobilisierung von ca. 100 RU (s. Abschn. 3.4.2) eingehalten. Zudem war der C1-Chip aufgrund der fehlenden Dextranmatrix stabiler für die durchgeführte Regeneration der Chipoberfläche mit 0,1 M HCl.

4.4 D1-Protein als biologische Einheit zur Entwicklung eines SPR-Biosensors zum Nachweis von PS-II-Herbiziden – Direkter Nachweis

Bei der klassischen Analytik können trotz der sehr aufwändigen Verfahren nur die Herbizide selbst innerhalb der Grenzwerte der Trinkwasserverordnungen (Trinkwasserverordnung der Europäischen Union, 1980; Trinkwasserverordnung Deutschland, 1990) nachgewiesen werden. Unbekannte Abbauprodukte der Herbizide, die eventuell noch stärker toxisch wirken können, und andere, noch unbekanntes phytotoxische Substanzen werden damit nicht erfasst.

Über den Einsatz eines Biosensors, basierend auf der biologischen Einheit des D1-Proteins, könnten diese Stoffe aufgrund ihrer Wirkung auf die Q_B -Bindenische des D1-Proteins nachgewiesen werden. Dazu sollte in dieser Arbeit das isolierte und funktionell bindefähige D1-Protein als biologische Einheit in einem Biosensor zum Nachweis von Photosystem-II-inhibierenden Herbiziden eingesetzt werden. Als Signaltransducer des Biosensors wurde die optische Methode der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) verwendet.

Bei der Entwicklung neuer Herbizide und bei der Untersuchung von Substanzen auf ihre herbizide Wirkung ist es aus Kostengründen notwendig, möglichst früh im Forschungsprozess viel über die Wirkungsweise und damit den Angriffspunkt neuer Substanzen zu erfahren, damit die Analysen auf die Wirkstoffe mit viel versprechenden oder neuen Wirkungsweisen konzentriert werden können (Eckes *et al.*, 2004). Ein auf dem D1-Protein basierender Biosensor würde also einen großen Fortschritt darstellen, da er ein Screening von Substanzen aufgrund ihrer Wirkungsweise an der Q_B -Bindenische des D1-Proteins in Echtzeit ermöglichen würde und so die bisherigen zeit-, kosten-, labor- und personalintensiven Tests der Substanzen auf ihre Wirkung ersetzen könnte (Eckes *et al.*, 2004).

Der in dieser Arbeit beschriebene Einsatz von aufgereinigtem D1-Protein als biologische Einheit in einem Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Gerät der Firma Biacore (Biacore AB, Uppsala, S) stellt eine Innovation dar. Bisher wurde noch kein Bericht über den Einsatz dieses Proteins als biologische Einheit in einem SPR-Gerät der Firma Biacore veröffentlicht. Darüber hinaus ist zum ersten Mal der direkte Nachweis von Herbiziden (< 300 Da) über die biologische Einheit des D1-Proteins in einem SPR-Biosensor gelungen. Der bislang einzige in der Literatur beschriebene Nachweis von Herbiziden über die Bindung an isoliertes D1-Protein in einem SPR-Biosensor stammt von Chegel *et al.* (1998). Dort wurde versucht, einen direkten Nachweis von Atrazin über D1-Protein-Multilayer zu erbringen; dieser Nachweis gelang jedoch nicht. Eine Herbizidbindung wurde dort nur indirekt bei D1-Proteinen nachgewiesen, die noch das Plastochinon in der Q_B-Bindungsnische gebunden hatten. Dabei kam es zu einem kompetitiven Prozess, bei dem das Plastochinon (750 Da) durch das Atrazin (216 Da) von der Q_B-Bindungsnische verdrängt wurde. Durch diesen Austausch des Bindepartners wurde dort infolgedessen eine Abnahme in der Molekülgröße (um 534 Da) hervorgerufen, die über eine Abnahme in der SPR-Antwort gemessen werden konnte.

Das über die in dieser Arbeit beschriebene Methode aufgereinigte D1-Protein besaß aufgrund der Aufreinigungsmethode kein gebundenes Plastochinon mehr. Dies konnte über die durchgeführten SPR-Messungen gezeigt werden, da es zu einer Erhöhung und nicht zu einer Verringerung der SPR-Antwort kam, wie es bei einer Verdrängung des Plastochinons durch ein kleineres Molekül (Herbizid) zu erwarten gewesen wäre (s. Abschn. 3.6).

In dieser Arbeit konnten die PS-II-Herbizide Atrazin, Metribuzin und Diuron infolgedessen mit einem direkten Bindungsassay nachgewiesen werden. Dies stellte eine zusätzliche Herausforderung dar, weil es sehr schwierig ist Moleküle kleiner als 300 Da mit der SPR-Methode nachzuweisen. Es konnte in diesem Fall nur erreicht werden, weil mit einem Biacore® 3000-Gerät gearbeitet wurde, welches bei der Messung mit speziellen Small-Molecules-Methoden (s. Anhang 7.4) Moleküle von bis zu 200 Da noch nachweisen kann (Biacore® 3000 Instrument Handbook, 2003). Aufgrund der Formel 3.1 (s. Abschn. 3.4.2) wird ersichtlich, warum es sehr schwer ist, so kleine Moleküle nachzuweisen. Das SPR-Signal ist abhängig von der Veränderung in der Oberflächen-Massenkonzentration des Analyten und hängt damit vom Molekulargewicht des Analyten in Relation zur Anzahl an Ligandenplätzen an der Chipoberfläche ab (BIAtechnology Handbook, 1998). Bei einem Molekulargewicht des D1-Proteins von ca. 38 kDa und des Atrazins von 214 Da erhält man bei einer 1:1-Bindungsreaktion und einem Immobilisierungslevel von 6.072 RU laut Formel 3.1 eine maximale Bindungskapazität (R_{\max}) von ca. 34 RU (s. Abschn. 3.6.1). Man benötigt

also ein sehr hohes Immobilisierungslevel an Liganden, damit man noch ein ausreichend hohes Messsignal erhält, um die kleinen Moleküle nachzuweisen, und die Antwort nicht im Grundrauschen des Gerätes liegt. Da das Biacore® 3000 ein Grundrauschen von weniger als 0,1 RU besitzt (Biacore® 3000 Instrument Handbook, 2003) und da eine spezielle Methode zum Messen von kleinen Molekülen eingesetzt wurde (s. Anhang 7.4 und Abschn. 2.16.5), bei der die geringsten Konzentrationschwankungen herausgerechnet werden können, da zudem ein „double referencing“ durchgeführt wurde (s. Abschn. 2.16.5), konnten die kleinen Moleküle hier direkt nachgewiesen werden. Daher musste nicht auf einen indirekten Assay ausgewichen werden. Dies ist von großer Bedeutung; denn so könnten bei einem zukünftigen Einsatz des D1-Biosensors für den Nachweis von PS-II-Herbiziden in Gewässern dort dann die Proben ebenfalls direkt gemessen werden. Zusätzlich bleibt der Verbrauch an D1-Protein bei einem direkten Assay geringer. Bei einem indirekten Bindungsassay müssten die Herbizidproben vor der SPR-Messung mit D1-Protein versetzt werden, bevor sie über einen Herbizidchip geleitet werden. Erfolgt dann die Inhibition dieses Proteins durch die in der Probe frei vorliegenden Herbizide, kann über die Bindungsabnahme ein Herbizidnachweis geführt werden.

Chegel *et al.* (1998) konnten mit ihrem indirekten Verdrängungsassay, bei dem das Plastochinon durch Atrazin von der Q_B-Bindenische verdrängt wurde, Atrazin bis zu einer Konzentration von 0,1 µg/ml nachweisen. Gut messbar waren die Signale jedoch erst ab einer Konzentration von 100-1000 µg/ml. In dieser Arbeit konnten mit dem D1-Biosensor Nachweise für Atrazin ab 40 µg/ml und für Diuron ab 20 µg/ml erbracht werden (s. Abschn. 3.6.2). Metribuzin zeigte die geringste Bindungsaffinität, hier waren Nachweise erst ab 80-100 µg/ml möglich (s. Abschn. 3.6.2). Die Messungen von Chegel *et al.* (1998) sind jedoch kritisch zu betrachten, da dort das D1-Protein nicht wie in dieser Arbeit (s. Abschn. 2.16.5.1) kovalent gekoppelt wurde. Sie leiteten im Gegensatz dazu das in PBS gelöste D1-Protein in einem Küvettenflusssystem bis zur Sättigung über die mit Thiolgruppen modifizierte Messfläche. Dabei formten sich über nicht-kovalente Wechselwirkungen mit der hydrophoben Thioloberfläche D1-Protein-Multilayer. Daher kann in den dortigen Sensorgrammen mit ihrer Abnahme im SPR-Messsignal, die als Verdrängung des Plastochinons durch Atrazin interpretiert wurde, nicht überprüft werden, ob diese Signalabnahme nicht ganz oder zum Teil auf dem Verlust des nicht festgebundenen D1-Proteins beruht. Deshalb ist die Nachweisgrenze von 0,1 µg/ml Atrazin bei Chegel *et al.* (1998) sehr kritisch zu betrachten. Dies umso mehr, als die von Chegel *et al.* (1998)

beobachtete Drift zu einem großen Anteil auf das Abwaschen des nur an die Chipoberfläche angelagerten D1-Proteins zurückzuführen sein dürfte.

Die in dieser Arbeit erstmalig beschriebene Verwendung einer kovalenten Kopplungsmethode für das D1-Protein (s. Abschn. 2.16.5.1) stellt damit einen entscheidenden Vorteil gegenüber der bei Chegel *et al.* (1998) beschriebenen Methode dar. Zusätzlich kann über die Verwendung von CM5-Chips mit einer Dextranmatrix (s. Abschn. 2.16.2.1 und 2.16.5.1) die Anzahl an gebundenen D1-Proteinen im Vergleich zu den Multilayern stark erhöht werden. Bei Chegel *et al.* (1998) wurden Proteinlayer mit einer Dicke von 7,5-9,5 nm gemessen. Dem steht die 100 nm dicke Dextranmatrix des CM5-Chips gegenüber, deren Dextranketten eine Vielzahl von Bindungsstellen besitzen, so dass diese Matrix die Bindungsstellen im Vergleich zu einer nackten Goldoberfläche stark erhöht (BIAtechnology Handbook, 1998). Die Dextranmatrix des CM5-Chips erhöht die Liganden-Immobilisierungskapazität der Chipoberfläche von typischerweise 1-5 ng/mm² für einen unmodifizierten C1-Chip um das 10-50fache auf bis zu 50 ng/mm².

Es wurde vermutet, dass durch die Separation des D1-Proteins aus der Thylakoidmembran und dem PS-II-Proteinkomplex die Sensitivität gegen die PS-II-Herbizide im Vergleich zu anderen biologischen Einheiten, z. B. im Vergleich zu den Chloroplasten-Thylakoiden (Schnabl und Trapmann, 2001), erhöht werden könnte, da das D1-Protein dann für die Bindung von PS-II-Inhibitoren besser zugänglich ist. Diese Hypothese konnte mit den Untersuchungen in dieser Arbeit noch nicht bestätigt werden (s. Abschn. 3.6). Da es sich hier allerdings noch um erste Versuche zur Entwicklung dieses D1-SPR-Biosensors handelt, ist davon auszugehen, dass über eine Optimierung der Aufreinigungsmethode sowie der biosensorischen Messmethode die Nachweisgrenze noch weiter gesenkt werden kann. Zusätzlich ist es möglich, eine Präkonzentrierung der Wasserproben, z. B. durch Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction = SPE), den biosensorischen Messungen vorzuschalten, um damit in einem nachweisbaren Bereich messen zu können. Dieses wird in der Literatur auch häufig angewandt, um geringe Nachweisgrenzen zu erreichen (Penalva *et al.*, 1999; Piletskaya *et al.*, 1999; Mallat *et al.*, 2001c).

Weitere Ansatzmöglichkeiten, die zu einer Erhöhung der Sensitivität führen könnten, sind die Entwicklung von anders gestalteten Chipoberflächen. So erscheint es z. B. möglich, das D1-Protein in eine Lipiddoppelschicht an einem L1-Chip (Biacore AB, Uppsala, S) einzubetten, die die ursprüngliche Struktur der Thylakoidmembran nachbildet. Dadurch könnte es zu einer Anordnung der D1-Proteine in der natürlichen Struktur kommen, so dass eventuelle

Denaturierungen eines Teils der Proteine, wie sie bei der hier verwandten Kopplungsmethode auftreten können, vermindert bzw. vermieden werden können.

Um einen Biosensor zu entwickeln, der reproduzierbare Daten liefert, ist es wichtig, dass die biologische Einheit für mehrere Zyklen bei Raumtemperatur aktiv bleibt (Koblizek *et al.*, 1998). Dies war bei dem hier entwickelten Biosensor über mehrere Messzyklen der Fall (s. Abschn. 3.6). Mit einem der D1-Protein-Chips konnten über mehrere Messzyklen zudem verschiedene PS-II-Herbizide (Diuron, Atrazin, Metribuzin) nachgewiesen werden (s. Abschn. 3.6.2). Für eine genaue Validierung dieses Biosensors sind jedoch weitere Tests mit zusätzlichen mit D1-Protein präparierten Chips und mit mehr Wiederholungen notwendig. Dabei sind auch weitere Variationen der Messbedingungen, wie z. B. die Änderung des Messpuffersystems und damit des pH-Wertes sowie die Messung bei verschiedenen Temperaturen, erforderlich. So haben z. B. Chegel *et al.* (1998) gezeigt, dass eine Variation des pH-Wertes des Messpuffers zu veränderten Sensitivitäten des D1-Proteins gegenüber dem Herbizid Atrazin führt. Dort konnte durch eine Verringerung des pH-Wertes die Sensitivität erhöht werden. Dies erklärten sie über pH-abhängige Konformationsänderungen des D1-Proteins, die zu einem erleichterten Zugang des Atrazinmoleküls zur Q_B -Bindenische führten. Über eine Verwendung von D1-Proteinen unterschiedlicher herbizid-mutierter Pflanzen, die resistent gegen verschiedene Herbizid-Klassen sind, könnten in einer Messung, bei der die D1-Proteine dreier unterschiedlicher Mutanten auf die drei verfügbaren Messflächen eines Sensorchips immobilisiert werden, schon genauere Aussagen über die Herbizidklasse der vermessenen Probe gemacht werden (Giardi *et al.*, 2000). Mit einem solchen Messaufbau wäre es dadurch möglich die Spezifität des D1-Biosensors zu erhöhen. Giardi *et al.* (2000) konnten mit einem Fluoreszenz-Biosensor, basierend auf isolierten Thylakoidmembranen unterschiedlicher D1-Mutanten, z. B. zwischen den Klassen der Harnstoff- und phenolischen Herbizide unterscheiden.

Hervorzuheben ist auch der parallel erzielte Nachweis einer Bindung von Atrazin an den PS-II-Proteinkomplex von *Vicia faba*, der im Gegensatz zu dem nicht erbrachten Nachweis einer Bindung an den gleichen Proteinkomplex von *Pisum sativum* stand (s. Abschn. 3.6.1). Der PS-II-Proteinkomplex von *Pisum sativum* kann als eine Negativ-Kontrolle angesehen werden, da es sich bei ihm um die gleiche funktionelle Einheit, mit der identischen Größe und den gleichen physikalischen Eigenschaften, wie bei dem PS-II-Proteinkomplex von *Vicia faba* handelt.

Eine aufschlussreiche Beobachtung war, dass der PS-II-Proteinkomplex aus *Vicia faba* relativ eine sehr viel höhere Bindungskapazität zeigte, als nach der Berechnung der maximalen

Bindungskapazität (R_{\max}) zu erwarten gewesen wäre. Bei einem Molekulargewicht des PS-II-Proteinkomplexes von ca. 250 kDa dürfte nach Formel 3.1 (s. Abschn. 3.4.2) theoretisch nur eine maximale Bindungskapazität an Atrazin von ca. 8 RU an dieser Chipoberfläche erreicht werden. Die hier jedoch tatsächlich zu verzeichnende Bindungskapazität von ca. 18 RU kann wahrscheinlich, wie schon bei Nakamura *et al.* (2003) für SPR-Messungen mit einem PS-II-Proteinkomplex aus Purpurbakterien beschrieben, auf eine Konformationsänderung des Proteinkomplexes und damit auf eine Änderung seiner elektrochemischen Eigenschaften zurückgeführt werden. Dieses Phänomen hat möglicherweise auch bei den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen zu einer Signalverstärkung geführt, wodurch die unerwartet hohe Antwort von ca. 18 RU zustande kam. Nakamura *et al.* (2003) konnten über diese beobachtete Signalverstärkung bei den über Genexpression synthetisierten und mit Histidinen markierten Reaktionszentren des Purpurbakteriums *Rhodobacter sphaeroides*, die über Nickel/NTA-Chelation (Nickel/Nitrilotriacetic-acid-Chelation) an einem NTA-Chip (Biacore AB, Uppsala, S) immobilisiert wurden, Atrazinkonzentrationen von bis zu 1 $\mu\text{g/ml}$ nachweisen. Diese Ergebnisse sind aufgrund der verwendeten nicht-kovalenten Immobilisierungsmethode jedoch kritisch zu betrachten, da es dort systembedingt zu einer hohen Drift gekommen sein dürfte. Auch Piletskaya *et al.* (1998) haben bei potentiometrischen Messungen die Änderung der elektrochemischen Eigenschaften des isolierten D1-Proteins durch die Bindung von Atrazin beobachtet und diese für die Detektion von Atrazin genutzt.

Damit stellt der PS-II-Proteinkomplex von *Vicia faba* eine alternative biologische Einheit zum D1-Protein für einen Biosensor zum Nachweis von PS-II-Herbiziden dar. Von Bedeutung war auch hier die Beobachtung, dass, wie bei den zuvor erzielten Ergebnissen, *Vicia faba* eine Sonderstellung unter den untersuchten Pflanzenspezies einnahm. Nur mit dem PS-II-Proteinkomplex von *Vicia faba* konnte Atrazin nachgewiesen werden (s. Abschn. 3.6.1). Diese Besonderheit lässt sich über die Beobachtungen während der Protein-Aufreinigung erklären. Nur bei *Vicia faba* wurden D1/D2-Dimere sowohl in den PS-II-Proteinkomplex-Extrakten als auch in den D1-Protein-Aufreinigungen gefunden (s. Abschn. 3.2.1 und 3.3.1). Über diese im Vergleich zu den anderen Pflanzenspezies, etwa *Pisum sativum*, stärkere Assoziation zwischen dem D1- und dem D2-Protein (s. Abschn. 4.2.1) kann die erhalten gebliebene Bindungsfähigkeit des PS-II-Proteinkomplexes von *Vicia faba* erklärt werden. Diese starke Bindung zwischen den beiden Proteinen ist wahrscheinlich bedingt durch die im Vergleich zu *Pisum sativum* andere Aminosäurezusammensetzung der Proteine bei *Vicia faba* und durch einen daraus resultierenden besseren Zusammenhalt, basierend auf mehr nicht-kovalenten Bindungen zwischen dem D1- und D2-Protein. Dies deckt sich auch

mit den Ergebnissen aus der qualitativen Kontrolle der Bindungsfähigkeit der isolierten D1-Proteine mit dem Simazinderivat-Chip (s. Abschn. 3.4.5). Die aufgereinigten D1-Proteine aus *Vicia faba* zeigten auch dort die höchste Bindungskapazität zu dem Simazinderivat.

Eine weitere Erklärung für die bessere Eignung des D1-Proteins bzw. des PS-II-Proteinkomplexes von *Vicia faba* für den biosensorischen Nachweis von PS-II-Inhibitoren setzt bei einer stabileren Q_B-Bindenische des D1-Proteins dieser Pflanze an. Auch dies könnte sich auf die Aminosäuresequenz, in diesem Falle der Q_B-Bindenische, zurückführen lassen. Durch deren Zusammensetzung mit Aminosäuren, die mehr nicht-kovalente Bindungen untereinander ausbilden, könnte eine höhere Stabilität erreicht werden. Schon durch den Austausch einer einzigen Aminosäure im Bereich der Q_B-Bindenische (Aminosäure 211 bis 275) kommt es zu Mutanten, die resistent gegen PS-II-Herbizide wie z. B. Atrazin und Diuron sind. Punktmutationen in der Q_B-Bindenische können z. B. zur Steigerung bzw. Abnahme der Bindungsaffinität gegenüber unterschiedlichen Herbiziden führen (Hock *et al.*, 1995a) (s. Abschn. 1.3).

Eine Erklärung für die zwischen *Vicia faba*, *Pisum sativum* und *Lactuca sativa* differierenden Bindungsnachweise von aufgereinigtem D1-Protein am Simazinderivat-Chip (s. Abschn. 3.4.5) könnte demzufolge eine, ebenfalls durch die Aminosäurezusammensetzung bedingte, stärkere Bindungsaffinität der Q_B-Bindenische von *Vicia faba* zu dem Simazinderivat sein.

4.5 Beurteilung des biosensorischen Nachweises von PS-II-Herbiziden über das D1-Protein in realen Gewässerproben – Ausblick

Biosensoren besitzen ein großes Potential für die Umweltüberwachung (Mallat *et al.*, 2001a). Innerhalb der Biosensoren hat sich in den letzten Jahren ein zunehmender Trend für die Verwendung von optischen Biosensoren, besonders von SPR-Biosensoren, entwickelt. Denn SPR-Biosensoren haben deutliche Vorteile gegenüber anderen Biosensoren. Besonders hervorzuheben sind hier die online-Überwachung der Proben sowie die markierungsfreie Technik, die eine direkte Messung des Analyten ohne eine vorhergehende Modifikation ermöglichen und innerhalb von Minuten das Ergebnis liefern. Damit ist eine wichtige Bedingung für die Messung von realen Gewässerproben erfüllt. Ein weiterer Vorteil im Vergleich zu vielen anderen Biosensoren stellt die Möglichkeit dar, die Affinität sowie insbesondere die Kinetik und die Thermodynamik des Messsystems zu ermitteln.

Für die Weiterentwicklung von Biosensoren zum Nachweis von PS-II-Herbiziden in Gewässern werden Rezeptormoleküle, die nicht aus Antikörpern bestehen, benötigt (Mallat *et al.*, 2001a). Diese Forderung erfüllt der in dieser Arbeit entwickelte D1-SPR-Biosensor. Mit

ihm wäre es in Zukunft möglich, einen Summenparameter an PS-II-Inhibitoren in Gewässern, wie z. B. Trinkwasser, Grundwasser, Oberflächenwasser, Abwasser, und auch in anderen wässrigen Extrakten von z. B. Lebensmitteln oder Böden nachzuweisen. Dagegen beruhen die meisten bisher entwickelten optischen biosensorischen Methoden zum Nachweis von PS-II-Inhibitoren auf dem Nachweis über Antikörper (Marco *et al.*, 1995; Penalva *et al.*, 1999; Killard *et al.*, 2000; Mallat *et al.*, 2001a, 2001b und 2001c; Mascini, 2001; Schlecht *et al.*, 2002).

Den Antikörpern gegenüber bietet das D1-Protein als biologische Einheit im Biosensor erhebliche Vorteile. Antikörper können immer nur die eine Substanz bzw. deren Analoga nachweisen, gegen die sie gerichtet sind. Beim Einsatz des D1-Proteins lässt sich dagegen eine Vielzahl an PS-II-Inhibitoren, etwa Atrazin, Simazin, Metribuzin, Diuron, Isoproturon, Propanil, Bromacil, Ioxynil und Irgarol, detektieren, die verschiedenen Stoffklassen, z. B. den Harnstoffderivaten, Chlortriazinen, Biscarbamaten, Uracilen, Nitrilen und den Heterozyklen, angehören (s. Abschn. 1.4). Ein D1-Protein-Biosensor könnte damit in den zu untersuchenden Gewässerproben einen Summenparameter an PS-II-Inhibitoren in einem einzigen Messschritt anhand der Wirkung auf die biologische Einheit ermitteln. Bei einer Messung mit Antikörpern wäre dagegen die Verwendung einzelner Messzellen mit verschiedenen immobilisierten Antikörpern, hergestellt gegen verschiedene Herbizide, notwendig. Somit wäre es mit dem Biacore® 3000 beispielsweise über die drei verfügbaren Messzellen (1 Referenzzelle) nur möglich, drei verschiedene PS-II-Herbizide nachzuweisen. Des Weiteren lässt sich die biologische Einheit des D1-Proteins durch das hier entwickelte Aufreinigungsverfahren sehr viel zeit- und kostengünstiger produzieren als ein Antikörper. Die Isolation des D1-Proteins kann innerhalb eines Tages erfolgen, während die Produktion eines polyklonalen Antikörpers bis zu drei Monate dauert. Zusätzlich kann die Produktion von Antikörpern nicht in jedem Labor erfolgen, da dafür bestimmte Tierschutzbestimmungen eingehalten werden müssen. Die Isolation des D1-Proteins kann mit der nötigen Ausstattung dagegen in jedem Labor erfolgen. Bei einer Langzeitstabilisierung der D1-Proteine über Lyophilisation, wie sie bei Piletskaya *et al.* (1999) beschrieben wurde, wäre es sogar möglich, die Proteine in einem Labor zu isolieren und von dort an die verschiedenen Anwender zu versenden.

Darüber hinaus würde für die biosensorische Untersuchung von realen Gewässerproben über Antikörper eine Vielzahl an Antikörpern benötigt, da sich in diesen Proben eine nicht zu bestimmende Anzahl an Kontaminationen befinden kann. Es müsste also mit erheblichem Kostenaufwand mit mehreren Chips und Messflächen oder mit Multikanalsystemen mit mehr

als vier Flusszellen gemessen werden, wie z. B. mit dem Biacore® T 100 (Biacore AB, Uppsala, S), das 16 Flusszellen besitzt. Hingegen können in einem D1-Protein-Biosensor über die Wirkungsweise auf das D1-Protein auch nicht als Herbizid wirkende phytotoxische Substanzen erfasst werden.

Nach der Trinkwasserverordnung für Deutschland (1990) sowie der Trinkwasserverordnung der Europäischen Union (1980) dürfen Pestizide im Trinkwasser eine Konzentration von 0,1 µg/l für Einzelsubstanzen und 0,5 µg/l für die Gesamtheit aller Pestizide nicht überschreiten. Für eine Einhaltung der in den Trinkwasserverordnungen geforderten Richtlinien müssen damit Nachweisgrenzen von 0,1 µg/l bzw. 0,5 µg/l unterschritten werden. Diese Nachweisgrenzen konnten mit dem hier entwickelten D1-SPR-Biosensor noch nicht erreicht werden. Bei einer Optimierung der Aufreinigungsmethode, der Messmethode wie auch der Immobilisierungsmethode (s. Abschn. 4.4) könnte es in Zukunft jedoch realisierbar werden, die Nachweisgrenze zu senken. Damit besäße dieser D1-Protein-Biosensor dann entscheidende Vorteile gegenüber den bisher verwendeten Biosensoren zum Nachweis von phytotoxischen Umweltschadstoffen.

Zusätzlich dürfte es über Konzentrierungstechniken wie die Festphasenextraktion (SPE) möglich sein, die Proben vor der biosensorischen Messung aufzukonzentrieren und darüber die von den Trinkwasserverordnungen geforderten Nachweisgrenzen zu erreichen.

4.6 Beurteilung der SPR-MS-Kopplung für Ihren Einsatz zur Kopplung des biosensorischen Nachweises von Herbiziden mit der klassischen Herbizidanalytik – Wirkungsbezogene Analytik

Mit dem D1-Protein als biologische Einheit im Biosensor ist nur eine Erfassung aller PS-II-inhibierenden Substanzen als Summenparameter in diversen Matrices möglich; eine genaue Qualifizierung der phytotoxikologischen Substanz oder Substanzen kann dabei jedoch nicht erfolgen.

Daher ist es in Zukunft sinnvoll, den wirkungsbezogenen biosensorischen Nachweis von PS-II-Inhibitoren mit der klassischen chemischen Analytik zu verbinden, um die Schadstoffe genau quantifizieren und qualifizieren zu können.

Dazu wurde in dieser Arbeit ein pflanzliches SPR-MS-Testsystem für die Kopplung des biosensorischen Nachweises mit der chemischen Analytik über die Massenspektrometrie entwickelt.

Dieser Ansatz der SPR-MS-Kopplung mit pflanzlichen Systemen war neuartig. Eine Anwendung der Kopplung von Oberflächen-Plasmon-Resonanz und direktem

massenspektrometrischen Nachweis bei pflanzlichen Systemen konnte in der vorliegenden Literatur nicht gefunden werden.

Mit dem Anti-Peroxidase-Antikörper ↔ Peroxidase-Testsystem wurde die erfolgreiche Kopplung des biosensorischen Nachweises über die SPR mit der chemischen Analyse über die MS nachgewiesen (s. Abschn. 3.7). Die Peroxidase konnte erfolgreich an den an der Sensoroberfläche immobilisierten monoklonalen Anti-Peroxidase-Antikörper gebunden und im Anschluss über die Methode des Biacore analyte recovery von der Chipoberfläche eluiert („recover“) sowie über die Massenspektrometrie sowohl identifiziert als auch quantifiziert werden (s. Abschn. 3.7). Dabei wurde nachgewiesen, dass die über die Bindungssignale im Biacore® 3000 ermittelten Quantitäten mit den über die MS gemessenen Quantitäten übereinstimmen.

Dieses Testsystem wurde für die zukünftige Kopplung des über die biologische Einheit des D1-Proteins erfolgenden biosensorischen Nachweises von PS-II-Inhibitoren mit deren Identifizierung über die MS entwickelt.

Ein solches System entspricht dem Ansatz der wirkungsbezogenen Analytik, bei der die wirkungsbezogene Quantifizierung der Schadstoffe über die Biosensorik mit der Identifizierung über klassische chemische Methoden gekoppelt wird (Obst und Brenner-Weiß, 2002).

Die wirkungsbezogene Analytik verbindet dabei die biomolekulare Erkennung über das biologische Wirkpotential mit der chemischen Analyse; sie vereint damit die Information über den Effekt auf die biologische Zielstruktur mit der chemischen Strukturanalyse und der Konzentrationsbestimmung an aktiven Substanzen in der Probe (Hock und Scheller, 2001).

Mit der wirkungsbezogenen Analytik eröffnet sich in Zukunft nicht nur die Perspektive, eine phytotoxische Substanz über deren Wirkungsweise auf das D1-Protein biosensorisch zu detektieren, sondern auch die Möglichkeit, sofort Aussagen über die Struktur und damit die Identität der Substanz zu treffen.

Für einen Einsatz eines solchen D1-Protein-SPR-Biosensors, gekoppelt mit der chemischen Analyse, in der Gewässerüberwachung, ließe sich die Anzahl an Proben verringern, die über die chemische Analytik untersucht werden müssten. Ohne den Einsatz einer solchen Kopplung müssten mit der klassischen Analytik alle Gewässerproben sehr zeit- und kostenaufwändig analysiert werden. Bei einer Kopplung der beiden Systeme müssten dagegen nur solche Proben über chemische Analyseverfahren untersucht werden, bei denen zuvor im SPR-D1-Biosensor ein positiver Nachweis von PS-II-Inhibitoren erbracht wurde.

Darüber hinaus würde sich mit dem Konzept der wirkungsbezogenen Analytik über die Kopplung des D1-Proteins-Biosensors mit der chemischen Analytik in Zukunft die Möglichkeit auftun, noch nicht identifizierte Umweltschadstoffe aufzudecken, deren Toxizitätseffekt auf das Ökosystem bzw. den Menschen vielleicht noch größer sein könnte als der bereits bekannter Schadstoffe.



5 Zusammenfassung

Pflanzenschutzmittel (Pestizide) werden in der Landwirtschaft und im privaten Bereich in großen Mengen zum Schutz der angebauten Kulturpflanzen vor Insekten, Pilzen oder konkurrierendem Wildwuchs eingesetzt. Allein in der Europäischen Union liegt der Umsatz bei den Herbiziden, der mit einem Marktanteil von 41 % wichtigsten Produktgruppe der Pflanzenschutzmittel, bei 2,7 Milliarden € pro Jahr.

Rückstände von Pflanzenschutzmitteln, insbesondere von Herbiziden, stellen eine immer weiter zunehmende Gefährdung für den Menschen und die Ökosysteme dar. Zum Schutz der menschlichen Gesundheit und der Umwelt hat der Gesetzgeber daher sehr niedrige Grenzwerte für Pestizide im Trinkwasser festgelegt. So darf nach der deutschen und nach der europäischen Trinkwasserverordnung die Summe aller Pestizide im Trinkwasser den Grenzwert von 0,5 µg/l nicht überschreiten. Für Einzelstoffe gilt ein Grenzwert von 0,1 µg/l.

Über moderne chemische Analyseverfahren können die entsprechenden Xenobiotika, etwa Herbizide, innerhalb dieser Grenzwerte nachgewiesen werden. Zum Teil ist jedoch für die einzelnen Analysen ein hoher experimenteller Aufwand notwendig. Ein anderes Problem besteht darin, dass die entsprechenden Abbauprodukte der Herbizide und andere, noch unbekannte phytotoxische Substanzen, die eventuell noch stärker toxisch wirken können, bei derartigen Messungen nicht vollständig erfasst werden. Seit vielen Jahren wird deshalb an der Entwicklung von Biosensoren gearbeitet, die für eine alternative Detektion von Herbizidrückständen, auf der Basis ihrer phytotoxischen Wirkung auf das pflanzliche Photosystem II (PS II), geeignet sind. Durch den Einsatz eines Biosensors, basierend auf der biologischen Einheit des D1-Proteins, könnten diese Stoffe aufgrund ihrer ökotoxikologischen Wirkung auf die biologische Einheit als Summenparameter erfasst werden.

Vor diesem Hintergrund war es Ziel der vorliegenden Arbeit, Untersuchungen zum Einsatz des D1-Proteins als biologische Einheit für den biosensorischen Nachweis von PS-II-Herbiziden durchzuführen. Dazu wurde ein Biosensor, basierend auf einem funktionell intakten Herbizid-bindefähigen D1-Protein aus dem Photosystem II höherer Pflanzen, zum Nachweis von Photosystem-II-inhibierenden Substanzen entwickelt.

Es wurde vermutet, dass durch die Isolation des D1-Proteins aus der Thylakoidmembran und dem PS-II-Proteinkomplex die Sensitivität gegen die PS-II-Herbizide im Vergleich zu anderen biologischen Einheiten, die auf einer Inhibierung der Q_B -Bindenische beruhen, z. B. dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor, erhöht werden könnte, da die Zielstruktur dann für die Bindung von PS-II-Inhibitoren besser zugänglich ist.

Für einen in Zukunft möglichen Einsatz des Biosensors als Überwachungssystem zum direkten Nachweis von PS-II-Inhibitoren in Wasserproben war es wichtig, eine Biosensortechnik zu entwickeln, die ohne eine Markierung der zu untersuchenden Analyten auskommt. Daher wurde die optische Methode der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) verwendet, die sehr sensitive Messungen in Echtzeit, ohne eine Markierung der Analyten, ermöglicht.

Für die Aufreinigung des D1-Proteins zum Einsatz als Zielstruktur im SPR-Biosensor sollte eine Isolationsmethode erarbeitet werden, die ein D1-Protein mit funktionell aktiver Q_B -Bindenische in hohen Ausbeuten, schnell und mit einem guten Aufreinigungsgrad liefert. Zur Isolation des D1-Proteins wurden daher verschiedene Methoden parallel untersucht und in ihrer Leistung miteinander verglichen, um die beste Methode für diesen Anwendungszweck zu finden.

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine Aufreinigungsmethode entwickelt, über die es möglich ist, funktionell aktives D1-Protein mit einer bindefähigen Q_B -Bindenische für PS-II-Inhibitoren zu isolieren.

Die Methode zur Isolierung und Aufreinigung des Membranproteins besteht im Wesentlichen aus folgenden Schritten: a) Thylakoidmembranisolation, b) Butanolextraktion von PS-II-Proteinkomplexen aus den Thylakoidmembranen und c) abschließende chromatographische Aufreinigung des D1-Proteins aus dem PS-II-Proteinkomplex über Reversed phase Fast protein liquid chromatography (RP-FPLC).

Der Nachweis des D1-Proteins in den einzelnen Aufreinigungsstufen konnte mit den klassischen Methoden der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und dem Western-Blotting erbracht werden.

Zusätzlich wurde eine ergänzende Methode zur biosensorischen Kontrolle der Aufreinigungsprozedur entwickelt und angewendet. Diese gestattet mit der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Methodik über einen spezifischen Anti-D1-Antikörper einen einfachen und schnellen Nachweis des D1-Proteins in isolierten Fraktionen.

Zur qualitativen Kontrolle der Bindefähigkeit des aufgereinigten D1-Proteins zu Herbiziden wurde eine SPR-Methode, basierend auf einem Simazinderivat (6- $\{[4\text{-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5\text{-triazin-2-yl]amino}\}$ -hexansäure) als Bindepartner, entwickelt, über die das aufgereinigte D1-Protein untersucht wurde.

Besonders hervorzuheben ist, dass in dieser Arbeit die Eignung verschiedener Pflanzenspezies der höheren Pflanzen (*Vicia faba*, *Pisum sativum* und *Lactuca sativa*) als Ausgangsmaterial für die Isolation eines Herbizid-bindefähigen D1-Proteins in hohen

Ausbeuten vergleichend charakterisiert wurde; das geschah anhand der klassischen Nachweismethoden sowie der Bindefähigkeit zu dem Simazinderivat.

In den Untersuchungen dieser Arbeit konnte über diese verschiedenen Methoden zur Charakterisierung nicht nur gezeigt werden, dass das D1-Protein über die hier entwickelte Aufreinigungsmethode aus allen drei Pflanzenspezies isoliert werden kann, sondern auch, dass es sich noch in einem funktionell bindefähigen Zustand befindet.

Anhand der entwickelten SPR-Methode, basierend auf einem Simazinderivat-Liganden, konnte die funktionelle Bindefähigkeit des aufgereinigten D1-Proteins aus allen drei Pflanzenspezies bestätigt werden.

Beim Vergleich der untersuchten Pflanzenspezies kristallisierte sich *Vicia faba* als die zur Isolation von D1-Protein am besten geeignete Spezies heraus. Sie lieferte die höchsten Ausbeuten an D1-Protein und zeigte in dem entwickelten Qualitätsnachweis über die SPR die beste Bindefähigkeit zu einem ausgewählten PS-II-Herbizid (Simazinderivat). Ferner war bemerkenswert, dass nur bei *Vicia faba* D1/D2-Dimere in den Isolaten der verschiedenen Aufreinigungsschritte gefunden wurden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das D1-Protein von *Vicia faba* für die weitere Verwendung als biologische Einheit im SPR-Biosensor ausgewählt. Die Stabilität des Zusammenhalts der D1/D2-Dimere bei *Vicia faba* während der Aufreinigung wurde als Grund für die beobachtete bessere Bindefähigkeit der Q_B-Bindenische zu PS-II-Herbiziden interpretiert.

Im Mittelpunkt des zweiten Teils der Arbeit stand der Einsatz des isolierten D1-Proteins für den biosensorischen Nachweis von PS-II-Herbiziden.

Mit dem in dieser Arbeit entwickelten D1-Protein-SPR-Biosensor konnte der direkte Nachweis der Herbizide Diuron, Atrazin und Metribuzin, bei einer Nachweisgrenze von 20 µg/ml für Diuron, 40 µg/ml für Atrazin und 80 µg/ml für Metribuzin, erbracht werden.

Eine Erhöhung der Sensitivität des isolierten D1-Proteins im Vergleich zu bisher entwickelten, auf der Inhibition der Q_B-Bindenische basierenden Biosensoren konnte damit hier nicht erreicht werden.

Da diese Werte weit oberhalb der von den Trinkwasserverordnungen festgelegten Maximalmenge an Pestiziden im Trinkwasser liegen (s. o.), sind für eine Anwendung des Biosensors im Rahmen des Nachweises von Herbiziden im Trinkwasser in Zukunft noch Optimierungen notwendig, um die Sensitivität des Biosensors zu erhöhen.

Der hier entwickelte Biosensor kann die Gesamtheit aller in einer Probe enthaltenen PS-II-Inhibitoren aufgrund ihrer Wirkungsweise auf das D1-Protein als Summenparameter erfassen. In weiteren Entwicklungen scheint es möglich, diesen wirkungsbezogenen Nachweis der PS-

II-Inhibitoren mit sensitiven chemischen Analysemethoden zu koppeln, um so die detektierten Schadstoffe direkt identifizieren zu können.

Als Vorarbeit dazu wurde in dieser Arbeit ein pflanzliches SPR-Massenspektrometrie-System, bestehend aus einem Anti-Peroxidase-Antikörper und pflanzlicher Peroxidase, als Testsystem für die zukünftig angestrebte Kopplung des wirkungsbezogenen biosensorischen Nachweises von PS-II-Inhibitoren mit der chemischen Analytik über Massenspektrometrie entwickelt.

Mit diesem System wurde gezeigt, dass der biosensorische Nachweis eines Analyten über sein Wirkpotential auf die biologische Zielstruktur mit der genauen Bestimmung der Substanz über massenspektrometrische Analysen reproduzierbar gekoppelt werden kann.

Damit konnte für die zukünftige Entwicklung eines Biosensors zum qualitativen und quantitativen Nachweis von PS-II-Inhibitoren eine Möglichkeit zur Verbindung des über die SPR-Biosensorik geführten wirkungsbezogenen Nachweises von PS-II-Inhibitoren (z. B. von Herbiziden) mit der klassischen Analytik der Massenspektrometrie aufgezeigt werden.

Mit einem solchen System könnte damit dem Konzept der wirkungsbezogenen Analytik entsprochen werden, bei der die biomolekulare Erkennung über das biologische Wirkpotential mit der chemischen Analyse verbunden wird, so dass die Information über den Effekt auf die biologische Zielstruktur mit der exakten chemischen Identifikation/Strukturanalyse und der Konzentrationsbestimmung der aktiven Substanzen in der Probe zusammengeführt wird.

Es handelt sich um eine nach künftiger Weiterentwicklung viel versprechende Kopplung, die dazu genutzt werden könnte, in der Gewässerüberwachung Wasserproben (z. B. Trinkwasser, Abwasser, Grundwasser) mit dem D1-Protein-SPR-Biosensor über das biologische Wirkpotential auf die Zielstruktur auf die Anwesenheit von PS-II-Inhibitoren innerhalb von Minuten zu untersuchen. Nur die aufgrund ihrer Wirkung auf die biologische Einheit als kontaminiert identifizierten Proben könnten unmittelbar danach mit der Methode der Massenspektrometrie identifiziert werden.

6 Literaturverzeichnis

- **Adamczyk M., Gabler J. C., Guanasekera A. H., Mattingly P. G. und Pan Y. (1997):** Immunoassay reagents for thyroid testing. 2. Binding properties and energetic parameters of a T4 monoclonal antibody and its Fab fragment with a library of thyroxine analogue biosensors using surface plasmon resonance. *Bioconjugate Chem.* 8: 133-145.
- **Adamczyk M., Johnson D. D., Mattingly P. G., Moore J. A. und Pan Y. (1998):** Immunoassay Reagents for thyroid testing. 3. Determination of the solution binding affinities of a T4 monoclonal antibody Fab fragment for a library of thyroxine analogues using surface plasmon resonance. *Bioconjugate Chem.* 9: 23-32.
- **Agarwal G. S. (1973):** New Method in the Theory of Surface Polaritons. *Phy. Rev. B* 8: 4768-4779.
- **Agrisera (2004):** www.agrisera.se/products/FAQPsbA.shtml.
- **Alfonso M., Collados R., Yruela I. und Picorel R. (2004):** Photoinhibition and recovery in a herbicide-resistant mutant from *Glycine max* (L.) Merr. Cell cultures deficient in fatty acid unsaturation. *Planta* 219: 428-439.
- **Allakhverdiev A., Šetlíková E., Klimov V. V. und Šetlík I. (1987):** In photoinhibited PSII particles pheophytin photoreduction remains unimpaired. *FEBS letters* 226: 186-190.
- **Anderson J. M. und Barrett J. (1979):** Chlorophyll-protein complexes of brown algae: P700 reaction center and light-harvesting complexes. In: Chlorophyll Organization and Energy Transfer in Photosynthesis. *Ciba Found Symp.*: 81-104.
- **Andersson B. und Aro E.-M. (1997):** Proteolytic activities and proteases of plant chloroplasts. *Physiol. Plant.* 100: 780-793.
- **Andersson B. und Styring S. (1991):** Photosystem II: Molecular organization, function and acclimation. In: Lee C. P. (Ed.): Current Topics in Bioenergetics, Vol. 16. *Academic Press Inc.*, San Diego, Orlando, Florida: 1-81.
- **Andreasson E., Svensson P., Weibull C. und Albertsson P.-Å. (1988):** Separation and characterization of stroma and grana membranes – evidence for heterogeneity in antenna size of both Photosystem I and Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 936: 339-350.

- **Arnon D. I. (1949):** Copper Enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24 (1): 1-15.
- **Arntz B. und Trebst A. (1986):** On the role of the Q_B protein of PSII in photoinhibition. *FEBS Letters* 194: 43-49.
- **Arntzen C. J., Ditto C. L. und Brewer P. E. (1979):** Chloroplast membrane alterations in triazine resistant *Amaranthus retroflexus* biotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 278-282.
- **Aro E.-M., Virgin I. und Andersson B. (1993):** Photoinhibition of photosystem II inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* 1143: 113-134.
- **Arsalane W., Parésys G., Duval J.-C., Wilhem C., Conrad R. und Büchel C. (1993):** A new fluorometric device to measure the *in vivo* chlorophyll a fluorescence yield in microalgae and its use as a herbicide monitor. *Eur. J. Phycol.* 28: 247-252.
- **Avramescu A., Rouillon R. und Carpentier R. (1999):** Potential for use of a cyanobacterium *Synechocystis* sp. Immobilized in poly(vinylalcohol): Application to the detection of pollutants. *Biotechnol. Techn.* 13: 559-562.
- **Barbato R., Friso G., Giardi M. T., Rigoni F. und Giacometti G. M. (1991):** Breakdown of the photosystem II reaction center D1 protein under photoinhibitory conditions: identification and localization of the C-terminal degradation products. *Biochemistry* 30: 10220-10226.
- **Barbato R., Friso G., Ponitcos M. und Barber J. (1995):** Characterization of the light-induced cross-linking of the α -subunit of cytochrome b559 and the D1 protein in isolated Photosystem II reaction centers. *J. Biol. Chem.* 270: 24032-24037.
- **Barber J. (1998):** Photosystem two. *Biochim. Biophys. Acta* 1365: 269-277.
- **Barber J. und Andersson B. (1992):** Too much of a good thing: Light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 17: 61-66.
- **Barber J., Chapman D. J. und Telfer A. (1987):** Characterisation of a PS II reaction centre isolated from the chloroplasts of *Pisum sativum*. *FEBS Letters* 220 (1): 67-73.
- **Barber J., Nield J., Morris E. P., Zheleva D. und Hankamer B. (1997):** The structure, function and dynamics of photosystem two. *Physiologia Plantarum* 100: 817-827.

- **Barengi B. und Krause G. H. (1985):** Inhibition of photosynthetic reactions by light. A study with isolated spinach chloroplasts. *Planta* 163: 218-226.
- **Bassi R., Peruffo A. dal B., Barbato R. und Ghisi R. (1985):** Differences in chlorophyll-protein complexes and composition of polypeptides between thylakoids from bundle sheaths and mesophyll cells in maize. *FEBS letters* 146: 589-595.
- **Bausch-Weis J. (1994):** Chloroplastenthylakoide als Herbizidindikatoren im Trinkwasser. Unveröffentlichte Diplomarbeit am Institut für Landwirtschaftliche Botanik, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
- **Bausch-Weis J., Overmeyer S. und Schnabl H. (1994):** Chloroplastenthylakoide als Herbiziddetektoren im Trinkwasser. *Vom Wasser* 83: 235-241.
- **Berg D., Tietjen K. und Wollweber D. (1999):** From genes to targets: impact of functional genomics on herbicide discovery. *Brighton Conference – Weeds* 2: 491-500.
- **Berthold D. A., Babcock G. T. und Yocum C. F. (1981):** A Highly Resolved, Oxygen-Evolving Photosystem II Preparation From Spinach Thylakoid Membranes. *FEBS Letters* 134: 231-234.
- **BIAapplications Handbook (1998):** Biacore AB, Uppsala, Schweden.
- **Biacore Kinetic and Affinity Analysis with Biacore – Level 1 (2003):** Biacore AB, Uppsala, Schweden.
- **Biacore Technology (2001):** An introduction to Biacore's SPR technology. Biacore AB, Uppsala, Schweden.
- **Biacore Technology Note 1 (2001):** Surface plasmon resonance. Biacore AB, Uppsala, Schweden.
- **Biacore Technology Note 18 (2003):** Analyte recovery in Biacore® 3000: optimized functions for SPR-MS applications. Biacore AB, Uppsala, Schweden.
- **Biacore Technology Note 2 (2002):** Recovering samples from Biacore® 3000 for mass spectrometry. Biacore AB, Uppsala, Schweden.
- **Biacore Technology Note 6 (2002):** Ligand Fishing with Biacore® 3000, Selective binding, recovery and identification by MALDI MS of a specific interaction partner. Biacore AB, Uppsala, Schweden.

- **Biacore® 2000/3000 Working with Small Molecules (2003):** Biacore AB, Uppsala, Schweden.
- **Biacore® 3000 Instrument Handbook (2003):** Biacore AB, Uppsala, Schweden.
- **Biacore® Sensor Surface Handbook (2003):** Biacore AB, Uppsala, Schweden.
- **BIAtchnology Handbook (1998):** Biacore AB, Uppsala, Schweden.
- **Biedinger U., Bickert C., Youngman R. J. und Schnabl H. (1991):** The formation of free lipid radicals during the electromanipulation of protoplasts (*Vicia faba*). *Bot. Acta* 104: 217-221.
- **Billinton N., Barker M. G., Michel C. E., Knight A. W., Heyer W.-D., Goddard N. J., Fielden P. R. und Walmsey R. M. (1998):** Development of a green fluorescent protein reporter for a yeast genotoxicity sensor. *Biosensors & Bioelectronics* 13: 831-838.
- **Boekema E. J., Hankamer B., Bald D., Kruij J., Nield J., Boonstra A. F., Barber J. und Rögner M. (1995):** Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 175-179.
- **Boekema E. J., Roon H. van, Clakoen F., Bassi R. und Dekker J. P. (1999):** Multiple Types of Association of Photosystem II and Its Light-Harvesting-Antenna in Partially Solubilized Photosystem II Membranes. *Biochemistry* 38 (8): 2233-2239.
- **Bolwell G. (2001):** Protein purification from plant sources. In: Roe S. (Ed.): Protein Purification Applications, 2. Edition. *Oxford University Press*, Oxford, New York: 135-158.
- **Bowlby N. R., Ghanotakis D. F., Yocum C. F., Peterson J. und Babcock G. T. (1988):** The functional unit of oxygen evolving activity: implications for the structure of photosystem II. In: Stevens S. E. Jr. und Bryant D. A. (Eds.): Light-Energy Transduction in Photosynthesis: Higher Plant and Bacterial Models. *The American Society of Plant Physiologists*, Rockville, MD: 215-226.
- **Bowyer J. R., Camilleri P. und Vermaas W. F. J. (1991):** Photosystem II and its interactions with herbicides. In: Baker N. R. und Percival M. P. (Eds.): Herbicides, Topics in Photosynthesis, Vol. 10. *Elsevier*, Amsterdam, London, New York: 27-85.

- **Bradford M. M. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- **Brewster J. D. und Lightfield A. R. (1993):** Rapid biorecognition assay for herbicides in biological matrices. *Anal. Chem.* 65: 2415-2419.
- **Brewster J. D., Lightfield A. R. und Bermel P. L. (1995):** Storage and immobilization of photosystem II reaction centers used in an assay for herbicides. *Anal. Chem.* 67: 1296-1299.
- **Cai S.-Q. und Xu D.-Q. (2002):** Light intensity-dependent reversible down-regulation and irreversible damage of PS II in soybean leaves. *Plant Science* 163: 847-853.
- **Canovas P. M. und Barber J. (1993):** Detection of a 10 kDa break-down product containing the C-terminus of the D1-protein in photoinhibited wheat leaves suggests an acceptor side mechanism. *FEBS Letters* 324: 341-344.
- **Carpenter S. D. und Vermaas F. J. (1989):** Directed mutagenesis to probe the structure and function of photosystem II. *Physiol. Plant.* 77: 436-443.
- **Castillo M., Alonso M. C. und Riu J. (2001):** Identification of cytotoxic compounds in European wastewaters during a field experiment. *Analytica Chimica Acta* 426 (2): 265-277.
- **Chapman D. J., Gounaris K. und Barber J. (1988):** Electron-transport properties of the isolated D1-D2-cytochrome b-559 Photosystem II reaction centre. *Biochimica et Biophysica Acta* 933: 423-431.
- **Chapman D. J., Gounaris K. und Barber J. (1989):** The D1/D2/Cytochrome b559 Photosystem Two Reaction Centre from *Pisum sativum* L.: Isolation, Characterization and Damage by Light. *Photosynthetica* 23 (3): 411-426.
- **Chapman D. J., Gounaris K., und Barber J. (1991):** Isolation and Characterisation of Thylakoid Membrane Proteins. In: Rogers L. J. (Ed.): *Methods in plant biochemistry*, Vol. 5. *Academic Press*, London, UK: 171-193.
- **Chegel V. I., Shirshov Yu. M., Piletskaya E. V. und Piletsky S. A. (1998):** Surface plasmon resonance sensor for pesticide detection. *Sensors and Actuators B* 48: 456-460.

- **Clark L. C. (1956):** Monitoring and control of blood and tissue O₂ tensions. *Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs.* 2: 41-49.
- **Cleland R. E. und Critchley C. (1985):** Studies on the mechanism of photoinhibition in higher plants. II. Inactivation by high light of PSII reaction centre function in isolated chloroplasts. *Photobiochem. Photobiophys.* 10: 83-92.
- **Cleland R. E., Melis A. und Neale P. J. (1986):** Mechanism of photoinhibition: photochemical reaction centre inactivation in system II of chloroplasts. *Photosynth. Res.* 9: 79-88.
- **Cohen W. S. und Baxter D. R. (1990):** Sulfhydryl reagents and energy-linked reactions in monocot thylakoids. *Plant Physiol.* 93: 1005-1010.
- **Conrad R., Büchel C., Wilhelm C., Aarslane W., Berkaloff C. und Duval J. C. (1993):** Changes in yield in *in-vivo* Fluorescence of chlorophyll a as a tool for selective herbicide monitoring. *J. Appl. Phycol.* 5 (5): 505-516.
- **Debus R. J. (1992):** The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta* 1102: 269-352.
- **Deisenhofer J. und Michel H. (1989):** The photosynthetic reaction center from the purple bacterium *Rhodospseudomonas viridis*. *Science* 245: 1463-1473.
- **Deisenhofer J., Epp O., Miki K., Huber R. und Michel H. (1984):** X-ray structure analysis of a membrane protein complex. Electron density map at 3 Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*. *J. Mol. Biol.* 180: 385-398.
- **Deisenhofer J., Epp O., Miki K., Huber R. und Michel H. (1985):** Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature* 318: 618-624.
- **Dekker J. H. und Sharkey T. D. (1992):** Regulation of photosynthesis in triazine-resistant and triazine-susceptible *Brassica napus*. *Plant Physiol.* 98: 1069-1073.
- **Dekker J. P., Betts S. D., Yocum C. F. und Boekema E. J. (1990):** Characterization by Electron Microscopy of Isolated Particles and Two-Dimensional Crystals of the CP47-D1-D2-Cytochrome *b*-559 Complex of Photosystem II. *Biochemistry* 29: 3220-3225.

- **Demeter S., Neale P. J. und Melis A. (1987):** Photoinhibition: impairment of the primary charge separation between P680 and pheophytin in PSII of chloroplasts. *FEBS Letters* 214: 370-374.
- **Diner B. A., Petrouleas V. und Wendoloski J. J. (1991):** The iron-quinone electron-acceptor complex of photosystem II. *Physiol. Plant.* 81: 423-436.
- **Draber W., Tietjen K., Kluth J. F. und Trebst A. (1991):** Herbicides in photosynthesis research. *Angew. Chem.* 3: 1621-1633.
- **Eckes P., Almsick C. van und Weidler M. (2004):** Gene expression profiling, a revolutionary tool in Bayer CropScience herbicide discovery. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 57 (1): 62-77.
- **Eshaghi S., Andersson B. und Barber J. (1999):** Isolation of a highly active PSII-LHCII supercomplex from thylakoid membranes by a direct method. *FEBS Letters* 446: 23-26.
- **Eshaghi S., Turcsányi E., Vass I., Nugent J., Andersson B. und Barber J. (2000):** Functional characterization of the PS II-LHC II supercomplex isolated by a direct method from spinach thylakoid membranes. *Photosynthesis research* 64: 179-187.
- **Farre M., Pasini O., Alonso M. C., Castillo M. und Barcel D. (2001):** Toxicity assessment of organic pollution in wastewaters using a bacterial biosensor. *Analytica Chimica Acta* 426 (2): 155-165.
- **Franks F. (1990):** Freeze Drying: From Empiricism to Predictability. *Cryo-Letters* 11: 93-110.
- **Gao Z.-Q., Wang G.-C. und Tseng C.-K. (2004):** Isolation and Characterization of Photosystem II of *Porphyra yezoensis* Ueda. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 36 (11): 780-785.
- **Garbers A., Reifarth F., Kurreck J., Renger G. und Parak F. (1998):** Correlation between protein flexibility and electron transfer from $Q_A^{\bullet-}$ to Q_B in PSII membrane fragments from spinach. *Biochemistry* 37: 11399-11404.
- **Genty B. E., Briantais J. M. und Baker N. R. (1989):** The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990: 87-92.

- **Ghanotakis D. F. und Yocum C. F. (1986):** Purification and properties of an oxygen-evolving reaction center complex from photosystem II membrane. *FEBS Letters* 197: 244-248.
- **Ghanotakis D. F., Demetriou D. M. und Yocum C. F. (1987):** Isolation and characterization of an oxygen-evolving Photosystem II reaction center core preparation and a 28 kDa Chl-a-binding protein. *Biochim. Biophys. Acta* 891: 15-21.
- **Giardi M. T., Esposito D., Leonardi C., Mattoo A., Margonelli A. und Angelini G. (2000):** Portable system for selective monitoring of herbicides based on fluorescence and resistant mutants to herbicides. *Patent*, Upica, Italy: 112.
- **Giardi M. T., Koblizek M. und Masojidek J. (2001):** Photosystem II-based biosensors for the detection of pollutants. *Biosensors and Bioelectronics* 16: 1027-1033.
- **Giardi M. T., Rigoni F. und Barbato R. (1992):** Q_B site modification and the binding of photosystem 2 directed inhibitors during photoinhibition. *Photosynthetica* 27 (1-2): 173-182.
- **Good N. E. (1961):** Inhibitors of the Hill reaction. *Plant Physiol.* 36: 788-803.
- **Goodrow M. H., Harrison R. O. und Hammock B. D. (1990):** Hapten Synthesis, Antibody Development, and Competitive Inhibition Enzyme Immunoassay for *s*-Triazine Herbicides. *J. Agric. Food Chem.* 38: 990-996.
- **Gounaris K. und Barber J. (1985):** Isolation and characterisation of photosystem II reaction centre lipoprotein complex. *FEBS Letters* 188: 68-72.
- **Greenberg B. M., Gaba V., Mattoo A. K. und Edelman M. (1987):** Identification of a primary in vivo degradation product of the rapidly turning-over 32 kDa protein of photosystem II. *The EMBO J.* 6: 2865-2869.
- **Haag E., Irrgang K. D., Boekema E. J. und Renger G. (1990):** Functional and structural analysis of photosystem II core complexes from spinach with high oxygen evolution capacity. *Eur. J. Biochem.* 189: 47-53.
- **Haggett B. G. D. (1994):** Mathematical-model of toxicity monitoring sensors incorporating microbial whole cells. *Analyst* 119: 197-201.

- **Hankamer B., Barber J. und Boekema E. J. (1997b):** Structure and Membrane Organization of Photosystem II in Green Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 641-671.
- **Hankamer B., Morris E., Nield J., Gerle C. und Barber J. (2001):** Three-Dimensional Structure of the Photosystem II Core Dimer of Higher Plants Determined by Electron Microscopy. *Journal of Structural Biology* 135: 262-269.
- **Hankamer B., Nield J., Zheleva D., Boekema E., Jansson S. und Barber J. (1997a):** Isolation and biochemical characterisation of monomeric and dimeric photosystem II complexes from spinach and their relevance to the organisation of photosystem II *in vivo*. *Eur. J. Biochem.* 243: 422-429.
- **Hansson Ö. Und Wydrzynski T. (1990):** Current perceptions of photosystem II. *Photosynth. Res.* 23: 131-162.
- **Hasler L., Ghanotakis D., Fedtke B., Spyridaki A., Miller M., Müller S. A., Engel A. und Tsiotis G. (1997):** Structural Analysis of Photosystem II: Comparative Study of Cyanobacterial and Higher Plant Photosystem II complexes. *Journal of Structural Biology* 119: 273-283.
- **Haußühl K., Andersson B. und Adamska I. (2001):** A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. *The EMBO Journal* 20 (4): 713-722.
- **Heever J. A. van der und Grobbelaar J. U. (1998):** In Vivo Chlorophyll A Fluorescence of *Selenastrum capricornutum* as a Screening Bioassay in Toxicity Studies. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35: 281-286.
- **Hincha D. K. und Schmitt J. M. (1995):** Long-term cryopreservation of thylakoid membranes. In: Day J. D. und McLellan M. R. (Eds): *Methods in Molecular Biology. Humana*, Totowa, New York, USA 38: 71-80.
- **Hippler M., Klein J., Fink A., Allinger T. und Hoerth P. (2001):** Towards functional proteomics of membrane protein complexes: analysis of thylakoid membranes from *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal* 28 (5): 595-606.

- **Hock B. und Scheller F. (2001):** Conclusions and Outlook. In: Bahadir M., Collins H.-J. und Hock B. (Eds.): Bioresponse-Linked Instrumental Analysis. *B. G. Teubner GmbH*, Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden: 187-189.
- **Hock B., Dankwardt A., Kramer K. und Marx A. (1995b):** Immunochemical techniques: antibody production for pesticide analysis. A review. *Analytica Chimica Acta* 311: 393-405.
- **Hock B., Fedtke C. und Schmidt R. R. (1995a):** Herbizide – Entwicklung, Anwendung, Wirkungen, Nebenwirkungen. *Thieme Verlag*, Stuttgart, New York.
- **Holzenburg A., Bewley M. C., Wilson F. H., Nicholson W. V. und Ford R. C. (1993):** Three-dimensional structure of photosystem II. *Nature* 363: 470-472.
- **Ikeuchi M., Yuasa M. und Inoue Y. (1985):** Simple and discrete isolation of an O₂-evolving PSII reaction center complex retaining Mn and the extrinsic 33 kDa protein. *FEBS Letters* 185: 316-322.
- **Ireland C. R., Telfer A., Covello P. S., Baker N. R. und Barber J. (1988):** Studies on the limitations of photosynthesis in leaves of the atrazine-resistant mutant of *Senecio vulgaris* L. *Planta* 173: 459-467.
- **Irrgang K.-D., Boekema E. J., Vater J. und Renger G. (1988):** Structural determination of the photosystem II core complex from spinach. *Eur. J. Biochem.* 178: 209-217.
- **IVA (2005):** Jahresbericht 2004/2005, Industrieverband Agrar (IVA). Hrsg.: Industrieverband Agrar e. V., Frankfurt. *Pressehaus Bintz-Verlag GmbH & Co. KG*, Offenbach.
- **Jansson C. und Mäenpää P. (1997):** Mutation: Site-Directed Mutagenesis for Structure-Function Analyses of the Photosystem II Reaction Center Protein D1. *Prog. Bot.* 58: 352-367.
- **Jockers R., Bier F. F. und Schmid R. D. (1993):** Specific binding of photosynthetic reaction centres to herbicide-modified grating couplers. *Anal. Chim. Acta* 280: 53-59.
- **Juhler R. K., Andreasson E., Yu S.-G. und Albertsson P.-Å. (1993):** Composition of photosynthetic pigments in thylakoid membrane vesicles from spinach. *Photosynthesis Research* 35: 171-178.

- **Jursinic P. A. und Percy R. W. (1988):** Determination of the rate limiting step for photosynthesis in nearly isonuclear rapeseed (*Brassic napus* L.) biotype resistant to atrazine. *Plant Physiol.* 88: 1195-1200.
- **Kanervo E., Murata N. und Aro E.-M. (1998):** Massive breakdown of the Photosystem II polypeptides in a mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth. Res.* 57: 81-91.
- **Kanervo E., Spetea C., Nishiyama Y., Murata N., Andersson B. und Aro E.-A. (2003):** Dissecting a cyanobacterial proteolytic system: efficiency in inducing degradation of the D1 protein of photosystem II in cyanobacteria and plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1607: 131-140.
- **Katz E. (2003):** Surface Plasmon Resonance-A method to analyze interfacial optical properties and to develop biosensors: <http://chem.ch.huji.ac.il/~eugeniik/spr.htm>.
- **Killard A. J., Smyth M. R., Grennan K., Micheli L. und Palleschi G. (2000):** Rapid antibody biosensor assays for environmental analysis. *Biochemical Society Transactions* 28: 81-84.
- **Koblizek M., Masojidek J., Komenda J., Kucera T., Pilloton R., Mattoo A. K. und Giardi M. T. (1998):** A Sensitive Photosystem II-Based Biosensor for Detection of a Class of Herbicides. *Biotechnology and Bioengineering* 60 (6): 664-669.
- **Komenda J., Lupinková L. und Kopecký J. (2002):** Absence of the *psbH* gene product destabilizes photosystem II complex and bicarbonate binding on its acceptor side in *Synechocystis* PCC 6803. *Eur. J. Biochem.* 269: 610-619.
- **Krause G. H., Koster S. und Wong S. C. (1985):** Photoinhibition of photosynthesis under anaerobic conditions studied with leaves and chloroplasts of *Spinacia oleracea* L. *Planta* 165: 430-438.
- **Krauss N., Hinrichs W., Witt I., Fromme P., Pritzkow W., Dauter Z., Betzel C., Wilson K. S., Witt H. T. und Saenger W. (1993):** Three-dimensional structure of system II of photosynthesis at 6 Å resolution. *Nature* 361: 326-331.
- **Kretschmann E. und Reather H. (1968):** Radiative decay of nonradiative surface plasmon excited by light. *Zeitung für Naturforschung* 23 A: 2135-2136.

- **Kröger S., Piletsky S. und Turner A. P. F. (2002):** Biosensors for marine pollution research, monitoring and control. *Marine pollution Bulletin* 45: 24-34.
- **Kuhl H., Kruip J., Seidler A., Krieger-Liszkay A., Bünker M., Bald D., Scheidig A. J. und Rögner M. (2000):** Towards Structural Determination of the Water-splitting Enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (27): 20652-20659.
- **Kuwabara T. und Murata N. (1979):** Purification and characterization of 33 kilodalton protein of spinach chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 581: 228-236.
- **Kyle D. J., Ohad I. und Arntzen C. J. (1984):** Membrane protein damage and repair: selective loss of a \square iron \square protein function in chloroplast membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 81: 4070-4074.
- **Lancaster C. R. D. und Michel H. (1999):** Refined Crystal Structures of Reaction Centres from *Rhodospseudomonas viridis* in Complexes with the Herbicide Atrazine and two Chiral Atrazine Derivatives also Lead to a New Model of the Bound Carotenoid. *J. Mol. Biol.* 286: 883-898.
- **Leegood R. C. und Walker D. A. (1988):** Chloroplasts. In: Hall J. L. und Moore A. L. (Eds.): Isolation of Membranes and organelles from plant cells, 3. Auflage. *Academic Press*, London: 185-210.
- **Lehninger A. L., Nelson D. L. und Cox M. M. (1994):** Prinzipien der Biochemie, 2. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- **Lindahl M., Spetea C., Hundal T., Oppenheim A., Adam Z. und Andersson B. (2000):** The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell* 12: 419-431.
- **Lindahl M., Tabak S., Cseke L., Pichersky E., Andersson B. und Adam Z. (1996):** Identification, characterization, and molecular cloning of a homologue of the bacterial FtsH protease in chloroplasts of higher plants. *J. Biol. Chem.* 271: 29329-29334.
- **Lindsay S. (1996):** Einführung in die HPLC. *Friedrich Vieweg und Sohn Verlagsgesellschaft mbH*, Braunschweig, Wiesbaden.
- **Liu H. Y., Wang G. C. und Hou H. S. (2004):** Fluorescence specificity of PS complex from *Undaria pinnatifida*. *Chinese Bulletin of Botany* 21: 444-448.

- **Löfås S. und Johnsson B. (1990):** A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 21: 1526-1528.
- **Loranger C. und Carpentier R. (1994):** A fast bioassay for phytotoxicity measurements using immobilized photosynthetic membranes. *Biotechnol. Bioeng.* 44: 178-183.
- **Lottspeich F. und Zorbas H. (1998):** Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, Berlin.
- **Lupínková L., Metz J. G., Diner B. A., Vass I. und Komenda J. (2002):** Histidine residue 252 of the Photosystem II D1 polypeptide is involved in a light-induced cross-linking of the polypeptide with the α subunit of cytochrome *b*-559: study of a site-directed mutant of *Synechocystis* PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta* 1554: 192-201.
- **Lyon M. K., Marr K. M. und Furcinitti P. S. (1993):** Formation and Characterization of Two-Dimensional Crystals of Photosystem II. *J. of Structural Biology* 110: 133-140.
- **Macholán L. (1991):** Biocatalytic membrane electrodes. In: Wise L. D. (Ed.): *Bioinstrumentation and Biosensors. Marcel Dekker*, New York.
- **Mallat E., Barceló D., Barzen C., Gauglitz G. und Abuknesha R. (2001a):** Immunosensors for pesticide determination in natural waters. *Trends in Analytical Chemistry* 20 (3): 124-132.
- **Mallat E., Barzen C., Abuknesha R., Gauglitz G. und Barceló D. (2001b):** Part per trillion level determination of isoproturon in certified and estuarine water samples with a direct optical immunosensor. *Analytica Chimica Acta* 426: 209-216.
- **Mallat E., Barzen C., Abuknesha R., Gauglitz G. und Barceló D. (2001c):** Fast determination of paraquat residues in water by an optical immunosensor and validation using capillary electrophoresis-ultraviolet detection. *Analytica chimica Acta* 427: 165-171.
- **Marco M.-P., Gee S. und Hammock B. (1995):** Immunochemical techniques for environmental analysis. I. Immunosensors. *Trends in Analytical Chemistry* 14: 341-350.
- **Markey F. (1999):** What is SPR anyway. *BIA Journal* 1: 14-17.
- **Marquart A. (2005):** <http://home.hccnet.nl/ja.marquart/BasicSPR/BasicSpr01.htm>.

- **Marr K. M., Mastronarde D. M. und Lyon M. K. (1996):** Two-Dimensional Crystals of Photosystem II: Biochemical Characterization, Cryoelectron Microscopy and Localization of the D1 and Cytochrome b559 Polypeptides. *Journal of Cell Biology* 132: 823-833.
- **Marty J.-L., Garcia D. und Rouillon R. (1995):** Biosensors: potential in pesticide detection. *Trends Anal. Chem.* 14: 329-333.
- **Mascini M. (2001):** Affinity electrochemical biosensors for pollution control. *Pure and Applied Chemistry* 73 (1): 23-30.
- **Mattoo A. K., Hoffman-Falk H., Marder J. B. und Edelman M. (1984):** Regulation of protein metabolism: coupling of photosynthetic electron transport to in vivo degradation of the rapidly metabolized 32-kilodalton protein of the chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1380-1384.
- **Mattoo A. K., Marder J. B. und Edelman M. (1989):** Dynamics of the Photosystem II Reaction Center. *Cell* 54: 241-246.
- **Mattoo A. K., Pick U., Hoffmann-Falk H. und Edelman M. (1981):** The rapidly metabolized 32.000-dalton polypeptide of the chloroplast is the proteinaceous shield regulating photosystem II electron transport and mediating \square uron herbicide sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1572-1576.
- **Merwe, P. A. van der (2003):** Surface Plasmon Resonance. <http://users.path.ox.ac.uk/~vdmerwe/Internal/spr.PDF>.
- **Merz D. (1995):** Miniaturisierte Fluoreszenzmissionsmessung an Thylakoiden zum Nachweis der Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes durch Photosystem II-Herbizide: Stabilisierung von Thylakoiden und Entwicklung eines Biosensors für Herbizide. Dissertation an der Universität Karlsruhe.
- **Merz D., Geyer M., Moss D. A. und Ache H.-J. (1996):** Chlorophyll fluorescence biosensor for the detection of herbicides. *Fresenius J. Anal. Chem.* 354: 299-305.
- **Michel H. und Deisenhofer J. (1988):** Relevance of the photosynthetic reaction centre from purple bacteria to the structure of PSII. *Biochemistry* 27: 1-7.
- **Michel H., Hunt D. F., Shabonowitz J. und Bennett J. (1988):** Tandem mass spectrometry reveals that three photosystem II proteins from spinach chloroplasts contain N-acetyl-O-phosphothreonine at their NH₂ termini. *J. Biol. Chem.* 263: 1123-1140.

- **Michel H., Weyer K. A., Gruenberg H., Dunger I., Oesterhelt D. und Lottspeich F. (1986):** The 'light' and 'medium' subunits of the photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*: isolation of the genes, nucleotide and amino acid sequence. *The EMBO J.* 5: 1149-1158.
- **Mizusawa N., Kimura Y., Ishii A., Yamanari T., Nakazawa S., Teramoto H. und Ono T. (2004):** Impact of Replacement of D1 C-terminal Alanine with Glycine on Structure and Function of Photosynthetic Oxygen-evolving Complex. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (28): 29622-29627.
- **Moskalenko A. A., Barbato G. und Giacometti G. M. (1992):** Investigation of the neighbour relationships between PS II polypeptides in the two types of isolated reaction centres (D1/D2/cytb559 and CP47/D1/D2/cytb559 complexes). *FEBS Letters* 314: 271-274.
- **Myszka D. G. (1999a):** Improving biosensor analysis. *J. Mol. Recogn.* 12: 279-284.
- **Myszka D. G. (1999b):** Survey of the 1998 optical biosensor literature. *Journal of Molecular Recognition* 12: 390-408.
- **Nagata K. und Handa H. (2000):** Real-Time Analysis of Biomolecular Interactions: Applications of Biacore. *Springer-Verlag*, Tokyo, Berlin, Heidelberg, New York.
- **Nakajima Y., Yoshida S., Inoue Y. und Ono T. (1995):** Effects of photosystem II inhibitors on photoinhibition and degradation of D1 protein. In: Mathis P. (Ed.): *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, Vol. IV. *Kluwer Academic Publishers*, Netherlands: 319-322.
- **Nakamura C., Hasegawa M., Nakamura N. und Miyake J. (2003):** Rapid and specific detection of herbicides using a self-assembled photosynthetic reaction center from purple bacterium on an SPR chip. *Biosensors and Bioelectronics* 18: 599-603.
- **Nakamura C., Hasegawa M., Shimada K., Shirai M. und Miyake J. (2000):** Direct Triazine Herbicide Detection Using a Self-Assembled Photosynthetic Reaction Center from Purple Bacterium. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* 5: 413-417.
- **Nakatani H. Y. und Barber J. (1977):** An Improved Method for Isolating Chloroplasts Retaining Their Outer Membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 461: 510-512.

- **Nakazato K., Toyoshima C., Enami I. und Inoue Y. (1996):** Two-dimensional Crystallization and Cryo-electron Microscopy of Photosystem II. *J. Mol. Biol.* 257: 225-232.
- **Nanba O. und Satoh K. (1987):** Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 109-112.
- **Nedbal I., Šetlíková J., Masojídek J. und Šetlík I. (1986):** The nature of photoinhibition in isolated thylakoids. *Biochimica et Biophysica Acta* 848: 108-119.
- **Nedelkov D. und Nelson R. W. (2003):** Surface plasmon resonance mass spectrometry: recent progress and outlooks. *Trends Biotechnol.* 21 (7): 301-305.
- **Nelson N. (1982):** Isolation of chloroplast photosystem I reaction center. In: Edelman M., Hallick R. B. und Chua N.-H. (Eds.): *Methods in Chloroplast Molecular Biology. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, Netherlands: 899-905.*
- **Nicholson W. V., Shepherd F. H., Rosenberg M. F., Ford R. C. und Holzenburg A. (1996):** Structure of photosystem II in spinach thylakoid membranes: comparison of detergent-solubilized and native complexes by electron microscopy. *Biochemical Journal* 315: 543-547.
- **Nield J., Orlova E. V., Morris E. P., Gowen B., Heel M. van und Barber J. (2000):** 3D map of the plant photosystem II supercomplex obtained by cryoelectron microscopy and single particle analysis. *Nature structural biology* 7 (1): 44-47.
- **Nixon P. J., Dyer T. A., Barber J. und Hunter C. N. (1986):** Immunological evidence for the presence of the D1 and D2 proteins in PS II cores of higher plants. *FEBS Letters* 209 (1): 83-86.
- **Obst U. und Brenner-Weiß G. (2002):** Zielgerichteter Stoffnachweis im Wasser – Wirkungsbezogene Analytik. *Chemie in unserer Zeit* 36 (3): 156-162.
- **Oetjen G. W. (1997):** Gefriertrocknen. *VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Deutschland.*
- **Oettmeier W. (1999):** Herbicide resistance and supersensitivity in photosystem II. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55: 1255-1277.

- **Oettmeier W., Hip U., Draber W., Fedtke C. und Schmidt R. R. (1991):** Structure-activity relationships of triazinone herbicides on resistant weeds and resistant *Chlamydomonas reinhardtii*. *Pest Sci.* 33: 399-409.
- **Oettmeier W., Masson K., Fedtke C., Konze J. und Schmidt R. R. (1982):** Effect of different photosystem II inhibitors on chloroplasts isolated from species either susceptible or resistant toward s-triazine herbicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 18: 357-367.
- **Ohad I., Koike H., Shochat S. und Inoue Y. (1988):** Changes in the properties of reaction centre II during the initial stages of photoinhibition as revealed by thermoluminescence measurements. *Biochimica et Biophysica Acta* 933: 288-298.
- **Ohki A., Kuboyama N., Koizumi K., Tanaka A., Sato Y., Kohno H., Böger P. und Wakabayashi K. (1999):** Mode of Action of Novel 2-(Benzylamino)-4-methyl-6-(trifluoromethyl)-1,3,5-triazine Herbicides: Inhibition of Photosynthetic Electron Transport and Binding Studies. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4398-4402.
- **Ort D. R., Ahrens W. H., Martin B. und Stoller E. W. (1983):** Comparison of photosynthetic performance in triazine resistant and susceptible biotypes of *Amaranthus hybridus*. *Plant Physiol.* 72: 925-930.
- **Otto A. (1968):** Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Zeitschrift für Physik A* 216: 398-410.
- **P06585 PSBA_PEA (2006):** <http://www.expasy.org/uniprot/P06585>.
- **P13910 PSBA_VICFA (2006):** <http://www.expasy.org/uniprot/P13910>.
- **P69557 PSBA_LACSA (2006):** <http://www.expasy.org/uniprot/P69557>.
- **Pandard P. L. und Rawson D. M. (1993):** An amperometric algal biosensor for herbicide detection employing a carbon cathode oxygen electrode. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 8: 323-333.
- **Penalva J., González-Martínez M. A., Puchades R., Maquieira A., Marco M. P. und Barceló D. (1999):** Immunosensor for trace determination of Irgarol 1051 in seawater using organic media. *Analytica Chimica Acta* 387: 227-233.

- **Pfister K., Steinback K. E., Gardner G. und Arntzen C. J. (1981):** Photoaffinity labelling of an herbicide receptor protein in chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 981-985.
- **Piletskaya E. V., Piletsky S. A., El'skaya A. V., Sozinov A. A., Marty J.-L. und Rouillon R. (1999):** D1 protein-an effective substitute for immunoglobulins in ELISA for the detection of photosynthesis inhibiting herbicides. *Analytica Chimica Acta* 398: 49-56.
- **Piletskaya E. V., Piletsky S. A., Lavrik, N. F. and Sozinov, A. A. (1997):** Konzentrationsbestimmung photosyntheseinhibierender Herbizide unter Nutzung von Chloroplastenmembranen und ihrer Komponenten. *Physiology and biochemistry of cultivated plants* 29: 234-240.
- **Piletskaya E., Piletsky S., Lavrik N., Masuchi Y. und Karube I. (1998):** Toward the D1 protein application for the development of sensors specific for herbicides. *Anal. Lett.* 31: 2577-2589.
- **Polyak B., Bassis E., Novodvoretz A., Belkin S. und Marks R. S. (2000):** Optical fiber bioluminescent whole-cell microbial biosensors to genotoxicants. *Water Science and Technology* 42 (1-2): 305-311.
- **Polyak B., Bassis E., Novodvoretz A., Belkin S. und Marks R. S. (2001):** Bioluminescent whole cell optical fiber sensor to genotoxicants: system optimization. *Sensors and Actuators B-Chemical* 74 (1-3): 18-26.
- **Popp P. (2004):** Mündliche Mitteilung Peter Popp, *Heinz Walz GmbH*, Effeltrich, Deutschland.
- **Powles S. B. und Björkman O. (1984):** Photoinhibition of photosynthesis: effect on chlorophyll fluorescence at 77 k in intact leaves and in chloroplast membranes of *Nerium oleander*. *Planta* 156: 97-107.
- **Preuss M. und Hall E. A. (1995):** Mediated herbicide inhibition in a PET biosensor. *Anal. Chem.* 67: 1940-1949.
- **Quinn J. G., O'Neill S., Doyle A., McAtamney C., Diamond D., MacCraith B. D. und O'Kennedy R. (2000):** Development and Application of Surface Plasmon Resonance-Based Biosensors for the Detection of Cell-Ligand Interactions. *Analytical Biochemistry* 281: 135-143.

- **Rao K. K., Hall D. O., Vlachopoulos N., Grätzel M., Evans M. C. W. und Seibert M. (1990):** Photoelectrochemical response of photosystem II particles immobilized on dye-derivatized TiO₂ films. *J. Photochem. Photobiol.* 5B: 379-389.
- **Rawson D. M., Willmer A. J. und Cardosi M. F. (1987):** The development of whole cell biosensor for online screening of herbicide pollution of surface water. *Toxicity Assess.* 2: 325-340.
- **Rawson D. M., Willmer A. J. und Turner A. P. F. (1989):** Whole-cell biosensors for environmental monitoring. *Biosensors* 4: 299-311.
- **Renger G. (1976):** Studies on the structural and functional organization of system II photosynthesis. The use of trypsin as a structurally selective inhibitor at the outer surface of thylakoid membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 440: 287-300.
- **Rhee K.-H., Morris E. P., Barber J. und Kühlbrandt W. (1998):** Three-dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8 Å resolution. *Nature* 396: 283-286.
- **Rhee K.-H., Morris E. P., Zheleva D., Hankamer B., Kühlbrandt W. und Barber J. (1997):** Two-dimensional structure of plant photosystem II at 8-Å resolution. *Nature* 389: 522-526.
- **Rich R. L. und Myszka D. G. (2000):** Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Current opinion in Biotechnology* 11: 54-61.
- **Rich R. L. und Myszka D. G. (2004):** Why you should be using more SPR biosensor technology. *Drug Discovery Today: Technologies* 1 (3): 301-308.
- **Rich R. L. und Myszka D. G. (2005):** Survey of the year 2003 commercial optical biosensor literature. *Journal of Molecular Recognition* 18: 1-39.
- **Rodriguez-Mozaz S., Marco M.-P., Lopez de Alda M. J. und Barceló D. (2004):** Biosensors for environmental monitoring of endocrine disruptors: a review article. *Anal. Bioanal. Chem.* 378: 588-598.
- **Roepstorff P., Sönksen C. P., Jansson Ö. Und Hämäläinen M. (1999):** A powerful combination: Biacore 3000 and MALDI-TOF MS. *BIA Journal* 6: 9-10.

- **Rögner M., Dekker J. P., Boekema E. J. und Witt H. T. (1987):** Size shape and mass of the oxygen-evolving photosystem II complex from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp. *FEBS Letters* 219: 207-211.
- **Roon H. van, Breemen J. F. L. van, Weerd F. L. de, Dekker J. P. und Boekema E. J. (2000):** Solubilization of green plant thylakoid membrane with *n*-dodecyl- α , D-maltoside. Implications for the structural organization of the Photosystem II, Photosystem I, ATP synthase and cytochrome b_6f complexes. *Photosynthesis Research* 64: 155-166.
- **Rouillon R., Tocabens M. und Carpentier R. (1999):** A photoelectrochemical cell for detecting pollutant-induced effects on the activity of immobilized cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Enzyme Microb. Technol.* 25: 230-235.
- **Rouillon R., Tocabens M. und Marty J.-L. (1994):** Stabilization of chloroplasts by entrapment in polyvinylalcohol bearing styrylpyridinium groups. *Anal. Lett.* 27: 2239-2248.
- **Santarius K. A. (1990):** Freezing of isolated thylakoid membranes in complex media. VI. The effect of pH. *Cryobiology* 27: 547-561.
- **Santini C., Tidu V., Tognon G., Ghiretti-Magaldi A. und Bassi R. (1994):** Three-dimensional structure of the higher-plant photosystem II reaction centre and evidence for its dimeric organization *in vivo*. *Eur. J. Biochem.* 221: 307-315.
- **Satoh K. und Butler W. L. (1978):** Low Temperature Spectral Properties of Subchloroplast Fractions Purified from Spinach. *Plant Physiology* 61: 373-379.
- **Satoh K., Nakatani H. Y., Steinback K. E., Watson J. und Arntzen C. J. (1983):** Polypeptide composition of a Photosystem II core complex presence of a herbicide-binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 724: 142-150.
- **Schlecht U., Nomura Y., Bachmann T. und Karube I. (2002):** Reversible Surface Thiol Immobilization of Carboxyl Group Containing Haptens to a BIAcore Biosensor Chip Enabling Repeated Usage of a Single Sensor Surface. *Bioconjugate Chem.* 13: 188-193.
- **Schlee D. (1992):** Ökologische Biochemie. *Gustav Fischer Verlag*, Jena, Stuttgart, New York.

- **Schnabl H. und Trapmann S. (2001):** Biomonitor systems derived from thylakoids for the detection of phytotoxic substances. In: Hock B., Bahadir M. und Collins H.-J. (Eds.): Bioresponse-linked instrumental analysis. Teubner Reihe Umwelt, *B.G. Teubner Verlag*, Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden: 153-168.
- **Schnabl H. und Youngman R. J. (1987):** A characterization of the effects of ecotoxicological substances on plant cell metabolic reactions. *Angew. Botanik* 61: 493-504.
- **Schnabl H., Helfrich P. und Trapmann S. (2000):** Plant thylakoid membranes and protoplasts as biological units for detection of phytotoxic compounds in water, air, soil and compost. In: Persoone G., Janssen C. und De Coen W. (Eds.): New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring. *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: 177-184.
- **Schreiber U. (1997):** Chlorophyllfluoreszenz und photosynthetische Energieumwandlung: Einfache einführende Experimente mit dem TEACHING-PAM Chlorophyll Fluorometer, 1. Ausgabe. *Heinz Walz GmbH*, Effeltrich, Germany.
- **Schulten C., Friebe A., Brandt A., Muktiono B. und Schnabl H. (2005):** Characterization of thylakoid membranes and PSII extracts isolated from different plant species. In: Est A. van der und Bruce D. (Eds.): Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives, Proceedings of the 13th International Congress on Photosynthesis. *International Society of Photosynthesis Research*, Montreal: 269-272.
- **Seitz T., Hoffmann M. G. und Krähmer H. (2003):** Chemische Unkrautbekämpfung – Herbizide für die Landwirtschaft. *Chemie in Unserer Zeit* 37: 112-126.
- **Sharma J., Panico M., Barber J. und Morris H. R. (1997a):** Purification and Determination of Intact Molecular Mass by Electrospray Ionization Mass Spectrometry of the Photosystem II Reaction Center Subunits. *Journal of Biological Chemistry* 272 (52): 33153-33157.
- **Sharma J., Panico M., Shipton C. C., Nilsson F., Morris H. R. und Barber J. (1997b):** Primary Structure Characterization of the Photosystem II D1 and D2 Subunits. *Journal of Biological Chemistry* 272 (52): 33158-33166.

- **Sinning I., Michel H., Mathis P. und Rutherford A. W. (1989):** Characterization of Four Herbicide-Resistant Mutants of *Rhodospseudomonas viridis* by Genetic Analysis, Electron Paramagnetic Resonance, and Optical Spectroscopy. *Biochemistry* 28: 5544-5553.
- **Sitte P., Ziegler H., Ehrendorfer F. und Bresinsky A. (1991):** Strasburger Lehrbuch der Botanik, 33. Auflage. *Gustav Fischer Verlag*, Stuttgart, Jena, New York.
- **Sönksen C., Nordhoff E., Jansson O., Malmqvist M. und Roepstorff P. (1998):** Combining MALDI mass spectrometry and biomolecular interaction analysis using a biomolecular interaction analysis instrument. *Anal. Chem.* 70: 2731-2736.
- **Stenberg E., Persson B., Roos H. und Urbaniczky C. (1991):** Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabelled proteins. *J. Coll. Interf. Sci.* 143: 513-526.
- **Svensson B., Vass I. und Styring S. (1991):** Sequence Analysis of the D1 and D2 Reaction Center Proteins of Photosystem II. *Zeitung für Naturforschung C* 46: 765-776.
- **Svensson B., Vass. I., Cedergren E. und Styring S. (1990):** Structure of donor side components in photosystem II predicted by computer modelling. *EMBO J.* 9: 2051-2059.
- **Swalen J. D. (1986):** Optical properties of Langmuir-Blodgett films. *J. Mol. Electron.* 2: 155-181.
- **Takahama U. (1982):** Suppression of carotenoid photobleaching by kaempferol in isolated chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 23 (5): 859-864.
- **Takahashi M., Shiraishi T. und Asada K. (1988):** COOH-terminal residues of D1 and the 44 kDa Cpa-2 at spinach photosystem II core complex. *FEBS Letters* 240 (1,2): 6-8.
- **Theg S. M., Filar L. J. und Dilley R. A. (1986):** Photoinactivation of chloroplasts already inhibited on the oxidising side of Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 849: 104-111.
- **Tietjen K. G., Kluth J. F., Andree R., Haug M., Linding M. und Müller K. H. (1990):** The herbicide binding niche of photosystem II – a model. *Pest. Sci.* 31: 65-72.

- **Towbin H., Staehelin T. und Gordon J. (1979):** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4250-4354.
- **Trapmann S. (1999):** Bestimmung von Herbizid-Kontaminationen durch einen Thylakoidsensor: Optimierung und Charakterisierung der biologischen Einheit. Dissertation am Institut für Landwirtschaftliche Botanik, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
- **Trapmann S., Extebarria N., Grobecker K. H. und Schnabl H. (1998):** Progress in herbicide determination with the thylakoid bioassay. *Environ. Sci. & Pollut. Res.* 5 (1): 17-20.
- **Trapmann S., Grobecker K. H., Pauwels J. und Schnabl H. (2000):** Characterisation of lyophilised thylakoids as a biological tool to detect herbicides. In: Persoone G., Janssen C. und De Coen W. (Eds.): *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: 191-195.*
- **Trebst A. (1986):** The Topology of the Plastoquinone and Herbicide Binding Peptides of Photosystem II in the Thylakoid Membrane. *Zeitung für Naturforschung* 41c: 240-245.
- **Trebst A. (1987):** The three-dimensional structure of the herbicide binding niche on the reaction center polypeptides of photosystem II. *Zeitung für Naturforschung* 42c: 742-750.
- **Trebst A. (1991):** A contact site between the two reaction center polypeptides of photosystem II is involved in photoinhibition. *Zeitung für Naturforschung* 46c: 557-562.
- **Trebst A. (1995):** Herbizide im Photosynthetischen Elektronentransport. In: Hock B. und Elstner E. F. (Ed.): *Schadwirkungen auf Pflanzen, Lehrbuch der Pflanzentoxikologie, 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford: 175-186.*
- **Trinkwasserverordnung der Europäischen Union (1980):** European Communities, Drinking Water Directive L229: 11.
- **Trinkwasserverordnung Deutschland (1990):** Verordnung über das Trinkwasser und Wasser für Lebensmittelbetriebe (Trinkwasserverordnung-TrinkV). Mai 1986: BGBI. I S. 760, Fassung der Bekanntmachung vom 5. Dezember 1990: BGBI. S. 2612, ber. 1991 I S. 227, BGBI III 2126-1-7.

- **Tsiotis G., Walz T., Spyridaki A., Lustig A., Engel A. und Ghanotakis D. (1996):** Tubular Crystals of a Photosystem II Core Complex. *Journal of Molecular Biology* 259: 241-248.
- **Turbadar T. (1959):** Complete Absorption of Light by Thin Metal Films. *Proc. Phys. Soc.* 73: 40-44.
- **Turner A. P. F. (1999):** Biosensors. In: McGraw-Hill Yearbook of Science & Technology. *McGraw-Hill*, New York: 39-42.
- **Turner A. P. F. (2000):** Biosensors – Sense and Sensitivity. *Science* 290: 1315-1317.
- **Turner A. P. F., Karube I. und Wilson G. S. (1987):** Biosensors: Fundamentals and Applications. *Oxford Press*, Oxford.
- **Tytler E. M., Whitlam G. C., Hipkins M. F. und Codd G. A. (1984):** Photoinactivation of photosystem II during photoinhibition in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Planta* 160: 229-234.
- **Vacha F., Joseph D. M., Durrant J. R., Telfer A., Klug D. R., Porter G. und Barber J. (1995):** Photochemistry and spectroscopy of a five-chlorophyll reaction center of photosystem II isolated by using a Cu affinity column. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2929-2933.
- **Velthuys B. R. (1981):** Electron-dependent competition between plastoquinone and inhibitors for binding to photosystem II. *FEBS Letters* 126: 277-281.
- **Vermaas W. F. J. und Arntzen C. J. (1983):** Synthetic Quinones Influencing herbicide Binding and Photosystem II Electron Transport. The Effects of Triazine-Resistance on Quinone Binding Properties in Thylakoid Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 725: 483-491.
- **Vermaas W. F. J., Arntzen C. J., Gu L.-Q. und Yu E.-A. (1983):** Interactions of Herbicides and Azidoquinones at a Photosystem II Binding Site in The Thylakoid Membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 723: 266-275.
- **Vitry C. de, Diner B. und Popot J.-L. (1991):** Photosystem II particles from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 266: 16641-16621.

- **Walz (1993):** Portable Fluorometer PAM-2000 and data acquisition software DA-2000 – Handbook of Operation, with examples of practical applications, 2. Edition. *Heinz Walz GmbH*, Effeltrich, Germany.
- **Walz (2001):** www.walz.com.
- **Wessels J. S. C. und Veen R. van der (1956):** The action of some derivatives of phenylurea and of 3-phenyl-1,1-dimethylurea on the Hill reaction. *Biochim. Biophys. Acta* 19: 548-549.
- **Wijk K. J. van, Andersson B. und Aro E.-M. (1996):** Kinetic resolution of the incorporation of the D1 protein into photosystem II and localization of assembly intermediates in thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 271: 9627-9636.
- **Wiklund R., Salih G., Mäenpää P. und Jansson C. (2001):** Engineering of the protein environment around the redox-active TyrZ in photosystem II. *European Journal of Biochemistry* 268: 5356-5364.
- **Williams J. C., Steiner L. A., Feher G. und Simon M. I. (1984):** Primary Structure of the L Subunit of the Reaction Center from *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7303-7307.
- **Yamada Y., Tang X.-S., Itoh S. und Satoh K. (1987):** Purification and properties of an oxygen-evolving photosystem II reaction-center complex from spinach. *Biochim. Biophys. Acta* 891: 129-137.
- **Yatsenko V. (1996):** Determinating the characteristics of water pollutants by neural sensors and pattern recognition methods. *J. Chromatogr. A* 722: 233-243.
- **Yoneyama K., Nakajima Y., Maejima N., Ogasawara M., Konnai M., Tokutake N., Iwamura H., Sato F., Ichinose K., Asami T. und Yoshida S. (1993):** Simple and rapid screening method for photosystem II inhibitory herbicides using photoautotrophically cultured plant cells with chlorophyll fluorescence monitoring. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 1389-1390.
- **Zheleva D., Hankamer B. und Barber J. (1996):** Heterogeneity and pigment composition of isolated Photosystem II reaction centers. *Biochemistry* 35: 15074-15079.

- **Zimmermann G. M., Kramer G. N. und Schnabl H. (1996):** Lyophilization of thylakoids for improved handling in a bioassay. *Environmental toxicology and chemistry* 15 (9): 1461-1463.
- **Zimmermann G. M., Trapmann S., Pauwels J. and Schnabl H. (1999):** Lyophilisation of Thylakoids: A Tool For Long-Term Stability Of The Biological Unit. *Cryo-Letters* 20: 229-234.
- **Zurawski G., Bohnert H. J., Whitfeld P. R. und Bottomley W. (1982):** Nucleotide sequence of the gene for the M_r 32.000 thylakoid membrane protein from *Spinacea oleracea* and *Nicotiana debneyi* predicts a totally conserved primary translation product of M_r 38.950. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7699-7703.

7 Anhang

7.1 Übersicht über die isolierten PS-II-Proteinkomplex-Extrakte

Bezeichnung des PS-II-Proteinkomplex-Extraktes	Datum	Pflanze	Isolationsmethode nach	Protein-gehalt des PS-II-Proteinkomplex-Extraktes [mg/ml]	Chloro-phyllgehalt der Thylakoide [µg/ml]	Yield der Thylakoide
PS II 1E1	11.07.02	Erbse	C& B	0,671	/	0,48
PS II 2 E1	09.09.02	Erbse	C& B	1,347	/	0,6
PS II 3 E1	22.10.02	Erbse	C& B	1,469	/	0,46
PS II 4 E1	07.11.02	Erbse	C& B	1,394	3116	0,55
PS II 5 E1	12.12.02	Erbse	C& B	0,326	2137	0,52
PS II 6 S	30.01.03	Spinat	Bassi	0,527	450	0,30
PS II 7 S	31.01.03	Spinat	C& B	2,152	524	0,38
PS II 8 B	03.02.03	Bohne	C& B		1453	0,22
PS II 9 B	04.02.03	Bohne	Bassi	0,323	622	0,12
PS II 10 B	20.02.03	Bohne	C& B	1,132	1550	0,52
PS II 11 K	26.02.03	Kopfsalat	C& B	0,285	1998	0,54
PS II 12 E1	26.05.03	Erbse	C& B	0,365	992	0,19
PS II 13 E1	06.06.03	Erbse	C& B	0,814	76	0,52
PS II 14 K	02.07.03	Kopfsalat	C& B	1,076	630	0,50
PS II 15 B	23.07.03	Bohne	C& B	0,781	1470	0,54
PS II 16 E2	30.07.03	Erbse	C& B	0,360	1207	0,45
PS II 17 B	06.08.03	Bohne	C& B	1,038	1802	0,50
PS II 18 E2	14.08.03	Erbse	C& B	0,463	921	0,52
PS II 19 E2	27.08.03	Erbse	C& B		808	0,40
PS II 20 K	22.10.03	Kopfsalat	C& B		399	0,23
PS II 21 K	13.11.03	Kopfsalat	C& B	0,4584	698	0,000
PS II 22 K	19.11.03	Kopfsalat	C& B	0,51	469	0,000
PS II 23 K	26.11.03	Kopfsalat	C& B	0,27	273	0,000
PS II 24 K	26.11.03	Kopfsalat	C& B	0,27	275	0,000
PS II 25 E1	03.12.03	Erbse	C& B	0,255	231	0,000
PS II 26 E2	03.12.03	Erbse	C& B	0,251	215	0,000
Ab Isolation PS II 28 E1 wurde der Yield der isolierten Thylakoide mit dem Toxy-PAM rot überprüft.						
Ab hier wurden nur noch bei caesar angezogene Pflanzen verwendet.						
PS II 28 E1	19.02.04	Erbse o. L	C& B	/	/	0,56
PS II 29 E1	20.02.04	Erbse o. L	Piletskaya	/	/	0,00
PS II 30 E1	26.02.04	Erbse o. L	Piletskaya	/	/	0,055
PS II 30 E1L	26.02.04	Erbse m. L	Piletskaya			0,11
PS II 31 E2	02.03.04	Erbse o. L	Piletskaya	0,17	/	0,14
PS II 31 E2L	02.03.04	Erbse m. L	Piletskaya	0,302	/	0,14
PS II 32 E1	29.03.04	Erbse o. L	Piletskaya	0,33	/	0,000
PS II 32 E2	29.03.04	Erbse o. L	Piletskaya		/	0,000
PS II 33 E1L	31.03.04	Erbse m. L	Piletskaya	0,47	1271	0,009
PS II 33 E2L	31.03.04	Erbse m. L	Piletskaya	1,16	1342	0,014
PS II 34 K	01.04.04	Kopfsalat o. L	Piletskaya	0,60	992	0,08
PS II 35 BL	05.04.04	Bohne m. L	Piletskaya	0,93	1447	0,04
PS II 36 E1L	07.04.04	Erbse m. L	Piletskaya	0,281	1198	0,0325
PS II 36 E1	07.04.04	Erbse o. L	Piletskaya	0,295	1529	0,1294

PS II 37 BL	08.04.04	Bohne m. L	Piletskaya	0,45	1027	0,0325
PS II 37 B	08.04.04	Bohne o. L	Piletskaya	0,23	968	0,1294
PS II 38 E1	27.04.04	Erbse o. L	Piletskaya	0,11	737	0,21
PS II 38 E2	27.04.04	Erbse o. L	Piletskaya	0,15	864	0,21
PS II 39 BL	28.04.04	Bohne m. L	Piletskaya	0,48	1938	0,32
PS II 39 B	28.04.04	Bohne o. L	Piletskaya	0,27	1803	0,22
PS II 40 K	29.04.04	Kopfsalat o. L	Piletskaya	0,16	678	0,08
PS II 40 KL	29.04.04	Kopfsalat m. L	Piletskaya	0,2	748	0,08
PS II 41 BT	07.05.04	Bohne o. L	Piletskaya	0,38	1481	0,23
PS II 41 B	07.05.04	Bohne o. L	Piletskaya	0,21	1132	0,23
PS II 42 K	10.05.04	Kopfsalat o. L	Piletskaya	0,24	725	0,12
PS II 42 KT	10.05.04	Kopfsalat o. L	Piletskaya	0,22	438	0,11
PS II 43 E1	11.05.04	Erbse o. L	Piletskaya	0,22	1387	0,21
PS II 43 E1T	11.05.04	Erbse m. L	Piletskaya	0,20	1177	0,16
PS II 44 E1L	26.07.04	Erbse m. L	Piletskaya	0,17		0,35
PS II 45 E1L	11.08.04	Erbse m. L	Piletskaya	0,244	/	0,37
PS II 46 E1L	18.08.04	Erbse m. L	Piletskaya	0,309	515	0,03
PS II 47 E1L	25.08.04	Erbse m. L	Piletskaya	0,099	1205	0,36
PS II 48 B	02.09.04	Bohne o. L	Piletskaya	0,211	1765	0,50
PS II 49 BL	05.10.04	Bohne m. L	Piletskaya	/	2372	0,49
PS II 50 E1L	03.11.04	Erbse m. L	Piletskaya	/	/	0,23
PS II 51 B	23.11.04	Bohne o. L	Piletskaya	0,1544	289	0,16
PS II 52 B	24.11.04	Bohne o. L	Piletskaya	0,197	589	0,07
PS II 53 BL	25.11.04	Bohne m. L	Piletskaya	0,234	1036	0,25
PS II 54 KL	09.12.04	Kopfsalat m L.	Piletskaya	0,164	331	0,12
PS II 55 E1	13.12.04	Erbse o. L	Piletskaya	0,169	444	
PS II 56 E2L	12.12.04	Erbse m. L	Piletskaya	0,159	503	
PS II 57 B	24.06.05	Bohne o. L	Piletskaya	1,057	673	0,55

Tab. 7.1: Übersicht über die durchgeführten PS-II-Extraktionen:

Angegeben sind das Datum der Isolation, die verwendete Pflanzenspezies, die Isolationsmethode und soweit gemessen der Proteingehalt der PS-II-Proteinkomplex-Extrakte (mg/ml). Ebenfalls ist der Yield sowie der Chlorophyllgehalt ($\mu\text{g/ml}$) der Thylakoide aus denen die PS-II-Proteinkomplex-Extrakte isoliert wurden dargestellt.

PS II = Photosystem-II-Proteinkomplex-Extrakt, Zahl = Nummer der Isolation, B = Bohne, E = Erbse, S = Spinat, K = Kopfsalat, 1 = var. *Feltham first*, 2 = var. *Maiperle*.

Bassi = aus nach Bassi et al. (1985) isolierten Thylakoiden hergestellt, Piletskaya = aus nach Piletskaya et al. (1997) isolierten Thylakoiden hergestellt, C & B = aus nach Cohen & Baxter (1990) isolierten Thylakoiden hergestellt.

L und m. L = mit künstlicher Zusatzbelichtung angezogene Pflanzen, ohne L und o. L. = ohne künstliche Zusatzbelichtung angezogene Pflanzen, T = am Ende der Thylakoidisolation in 50 mM Tris pH 8,0 aufgenommene Thylakoide Chlorophyllgehalt ($\mu\text{g/ml}$) und Yield der Thylakoide aus denen der PS-II-Proteinkomplex-Extrakt hergestellt wurde. Ab Isolation PS II 28 E1 wurde der Yield der isolierten Thylakoide mit dem Toxy-PAM rot (Caesar) überprüft. Bei allen vorhergehenden Isolationen wurde immer das PAM-2000 (IMBIO) verwendet.

Bis zur Isolation PS II 28 E1 wurden die Pflanzen in einer Klimakammer mit künstlicher Belichtung (s. Abschn. 2.2.1) angezogen, ab Isolation PS II 28 E1 wurden die Pflanzen in einem Gewächshaus mit oder ohne künstliche Zusatzbelichtung angezogen (s. Abschn. 2.2.2).

7.2 Übersicht über die durchgeführten SPR-Messungen mit Anti-D1-Antikörper-Chips

PS-II-Extrakt	SPR-Nachweis von D1-Protein über Anti-D1-AK	FPLC-Aufreinigungsmethode nach/Konzentrierungsmethode des PS-II-Extraktes	Säule	Gradient	Konzentrierungsmethode der FPLC-Fraktion-en	Konzentrierungsfaktor	Entspricht einer 1-Propanol Konzentration von/Zeit (min)
CM5-Chip No. 2							
PS II 10 B	Fraktionen 32-35	Sharma ungefiltert	RP-C4 Vydac	(1)	Vakuumentrifugation über Nacht	1:3,33	41-48 % 1-Propanol/ 32-36 min
PS II 12 E1	Fraktionen 36 + 37	Sharma Millex®-HV	RP-C4 Vydac	(1)	Vakuumentrifugation über Nacht	1:3,33	47-51 % 1-Propanol/ 36-38 min
CM5-Chip No. 3							
PS II 20 K	Kein Nachweis	Sharma Microcon YM-10	RP-C4 Vydac	(1)	Vakuumentrifugation 10 h	1:3,33	/
PS II 21 K	Kein Nachweis	Sharma Microcon YM-10	RP-C4 Vydac	(1)	Vakuumentrifugation 10 h	1:3,33	/
PS II 22 K	Kein Nachweis	Sharma Microcon YM-10	RP-C4 Vydac	(1)	Vakuumentrifugation 10 h	1:3,33	/
CM5-Chip No. 7							
PS II 13 E	Kein Nachweis	Sharma ungefiltert	RP-C4 Vydac	(1)	Vakuumentrifugation 5 h	1:3,33	/
PS II 15 B	Kein Nachweis	Sharma ungefiltert	RP-C4 Vydac	(1)	Vakuumentrifugation 5 h	1:3,33	/
PS II 16 E2	Kein Nachweis	Sharma Microcon YM-10	RP-C4 Vydac	(1)	Vakuumentrifugation 10 h	1:3,33	/
PS II 17 B	Kein Nachweis	Sharma Amicon Ultra-4	RP-C4 Vydac	(1)	Vakuumentrifugation 10 h	1:3,33	/
PS II 18 E2	Kein Nachweis	Sharma Microcon YM-10	RP-C4 Vydac	(1)	Vakuumentrifugation 10 h	1:3,33	/
CM5-Chip No. 8							
PS II 19 E2	Fraktionen 39-42	Sharma Centricon YM-10	RP-C4 Vydac	(1)	Vakuumentrifugation 10 h	1:3,33	53-60 % 1-Propanol/ 53-60 min

CM5-Chip No. 21							
PS II 47 E1L Lauf 3	Kein Nachweis	Sharma Lyophilisiert	RP-C18 Biorad C18 Vorsäule Vydac	(2)	Vaku- zen- tri- fuga- tion 10 h	1:3,5	/
PS II 47 E1L Lauf 5	Kein Nachweis	Sharma Lyophilisiert	RP-C18 Biorad Vorsäule C18 Vydac	(2)	Lyo- philisiert	1:3	/
PS II 47 E1L Lauf 6	Kein Nachweis	Sharma Lyophilisiert	RP-C18 Biorad Vorsäule C18 Vydac	(2)	Lyo- philisiert	1:3,33	/
PS II 47 E1L Lauf 7	Kein Nachweis	Sharma Lyophilisiert	RP-C18 Biorad Vorsäule C18 Vydac	(2)	Lyo- philisiert	1:3,33	/
PS II 48 B	Fraktionen 21-23	Sharma Lyophilisiert	RP-C18 Biorad Vorsäule C18 Vydac	(2)	Lyo- philisiert	1:3,33	48-55 % 1-Propanol/ 39- 42 min
PS II 49 BL	Fraktionen 18 + 19	Sharma Lyophilisiert	RP-C18 Biorad Vorsäule C18 Vydac	(2)	Lyo- philisiert	1:3,5	43-45 % 1-Propanol/ 36- 38 min
CM5-Chip No. 24							
PS II 53 BL	Kein Nachweis	Sharma lyophilisiert	RP-C18 Vydac, Vorsäule C18 Vydac	(1)	Lyo- philisiert	1:5,88	33-38 % 1-Propanol/ 22- 25 min
PS II 53 BL	Kein Nachweis	Sharma lyophilisiert	RP-C18 Vydac, Vorsäule C18 Vydac	(1)	Lyo- philisiert	1:5,88	33 % 1-Propanol/ 22 min
PS II 54 KL	Kein Nachweis	Sharma lyophilisiert	RP-C18 Vydac, Vorsäule C18 Vydac	(1)	Lyo- philisiert	1:5,88	/
PS II 55 E1	Kein Nachweis	Sharma lyophilisiert	RP-C18 Vydac, Vorsäule C18 Vydac	(1)	Lyo- philisiert	1:5,88	30-33% 1-Propanol/ 20- 22 min

Tab. 7.2: Übersicht über den Nachweis von D1-Proteinen in den Fraktionen der FPLC-Aufreinigungen und die Aufreinigungsbedingungen der verschiedenen PS-II-Proteinkomplex-Extrakte.

PS II = Photosystem-II-Proteinkomplex-Extrakt, Zahl = Nummer der Isolation, B = Bohne, E = Erbse, S = Spinat, K = Kopfsalat, 1 = var. *Feltham first*, 2 = var. *Maiperle*.

Sharma = FPLC-Aufreinigungsmethode nach Sharma *et al.* (1997a), RP-C18 = Reversed-phase-Säule mit C18-Material, RP-C4 = Reversed-phase-Säule mit C4-Material, C18 = Kieselgel mit Octadecylgruppen, C4 = Kieselgel mit Butylgruppen, Vydac = Grace Vydac, Hesperia, USA; Biorad = Bio-Rad, München, D; linear = linearer Gradient der mobilen Phase; isokrat. = isokratischer Lauf der mobilen Phase.

Vakuumentrifugation s. Abschnitt 2.10.1, Lyophilisation s. Abschnitt 2.9, Microcon YM-10 = Konzentrierungseinheit mit einem Molekulargewichts-cut-off von 10.000 Da (s. Abschn. 2.10.2), Amicon Ultra-4 = Konzentrierungseinheit mit einem Molekulargewichts-cut-off von 10.000 Da (s. Abschn. 2.10.2), Centricon YM-10 = Konzentrierungseinheit mit einem Molekulargewichts-cut-off von 10.000 Da (s. Abschn. 2.10.2), Millex®-HV = Spitzenfilter mit 0,45 µm Porengröße und 4 mm Durchmesser (s. Abschn. 2.11). (1) = Auftrennungsgradient 1, s. Abschnitt 2.5.1; (2) = Auftrennungsgradient 2, s. Abschnitt 2.5.1. CM5-Chip = Biacore-Sensorchip mit carboxymethylierter Dextranmatrix (Biacore AB, Uppsala, S).

7.3 Hemmung des PET durch PS-II-Inhibitoren

Konzentration [µg/l]	Diuron Hemmung PET [%] (Stabw [%])	Atrazin Hemmung PET [%] (Stabw [%])	Metribuzin Hemmung PET [%] (Stabw [%])	Simazin Hemmung PET [%] (Stabw [%])	Simazinderivat Hemmung PET [%] (Stabw [%])	Irgarol Hemmung PET [%] (Stabw [%])
80600					51,94 (1,63)	
8060					25,55 (1,66)	
250		48,80 (0,34)	35,97 (3,32)			
100					4,00 (0,98)	
75					2,17 (1,01)	
50	68,87 (2,98)			37,95 (2,66)	1,04 (0,70)	
25	60,73 (4,91)	37,86 (1,24)	24,20 (3,82)	23,80 (5,66)		78,78 (0,25)
12,5		29,30 (1,74)		14,17 (4,24)		
10	45,95 (1,72)					
5				7,23 (1,44)		
2,5	26,93 (0,30)		2,5 (4,40)			62,35 (0,54)
1,25	16,00 (0,97)	3,17 (0,89)				45,63 (1,99)
1				4,36 (2,83)		
0,625	8,14 (0,27)					
0,3125	3,50 (1,34)					
0,25						8,90 (2,12)
0,125	1,70 (1,12)					
0,1				1,56 (1,57)		

Tab. 7.3: Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes (PET) in % zur Kontrolle durch verschiedene PS-II-Inhibitoren.

Stabw = Standardabweichung, PET = photosynthetischer Elektronentransport.

7.4 Small-molecules-MDL-Methode

```
DEFINE APROG SolventCorrection_1
PARAM %c1 %c2 %c3 %c4 %c5 %c6 %c7 %c8
CAPTION SolventCorrection
FLOW 30
* QUICKINJECT %c1 15
-10 RPOINT -b baseline
22 RPOINT solvcorr_1

* QUICKINJECT %c2 15
-10 RPOINT -b baseline
22 RPOINT solvcorr_1

* QUICKINJECT %c3 15
-10 RPOINT -b baseline
22 RPOINT solvcorr_1

* QUICKINJECT %c4 15
-10 RPOINT -b baseline
22 RPOINT solvcorr_1

* QUICKINJECT %c5 15
-10 RPOINT -b baseline
22 RPOINT solvcorr_1

* QUICKINJECT %c6 15
-10 RPOINT -b baseline
22 RPOINT solvcorr_1

* QUICKINJECT %c7 15
-10 RPOINT -b baseline
22 RPOINT solvcorr_1

* QUICKINJECT %c8 15
-10 RPOINT -b baseline
22 RPOINT solvcorr_1

END
```

```
DEFINE APROG SolventCorrection_2
PARAM %c1 %c2 %c3 %c4 %c5 %c6 %c7 %c8
CAPTION SolventCorrection
FLOW 30
* QUICKINJECT %c1 15
```

-10 RPOINT -b baseline
22 RPOINT solvcorr_2

* QUICKINJECT %c2 15

-10 RPOINT -b baseline
22 RPOINT solvcorr_2

* QUICKINJECT %c3 15

-10 RPOINT -b baseline
22 RPOINT solvcorr_2

* QUICKINJECT %c4 15

-10 RPOINT -b baseline
22 RPOINT solvcorr_2

* QUICKINJECT %c5 15

-10 RPOINT -b baseline
22 RPOINT solvcorr_2

* QUICKINJECT %c6 15

-10 RPOINT -b baseline
22 RPOINT solvcorr_2

* QUICKINJECT %c7 15

-10 RPOINT -b baseline
22 RPOINT solvcorr_2

* QUICKINJECT %c8 15

-10 RPOINT -b baseline
22 RPOINT solvcorr_2

END

DEFINE APROG Screening

PARAM %pos %comp %conc %mw

KEYWORD comp %comp

KEYWORD mw %mw

FLOW 30

* KINJECT %pos 30 300 !injection of compound

-10 RPOINT -b Baseline

15 RPOINT bindearly

50 RPOINT bindlate

65 RPOINT stabearly

115 RPOINT stablate

Anhang

```
WASHPOS s rr2 !wash solution 50%DMSO

WASH s
WASHPOS n rr2 -v100 !wash solution 50%DMSO

WASH n
* QUICKINJECT rr4 30 !carry-over control

-10 RPOINT -b co_Baseline
15 RPOINT co_bindearly
50 RPOINT co_bindlate
65 RPOINT co_stabearly
115 RPOINT co_stablate
END
```

DEFINE LOOP Screening

```
LPARAM %pos %comp %conc %mw
TIMES 1
r2a1 startup 0 0 !running buffer
r2a2 startup 0 0 !running buffer
r2a3 startup 0 0 !running buffer
r2a4 startup 0 0 !running buffer
r2a5 startup 0 0 !running buffer
r2c1 negcontrol 0 0
r2b1 Atrazin1 10u 215
r2c2 negcontrol 0 0
r2b2 Atrazin2 20u 215

r2c3 negcontrol 0 0

r2b3 Atrazin3 40u 215
r2c4 negcontrol 0 0
r2b4 Atrazin4 60u 215
r2c5 negcontrol 0 0
r2b5 Atrazin5 80u 215
r2c6 negcontrol 0 0
r2b6 Atrazin6 100u 215
r2c7 negcontrol 0 0
r2c8 negcontrol 0 0
```

END

MAIN

```
RACK 1 thermo_C
```

RACK 2 thermo_B
RACK r REAG_A

temp 25
prime
detection 2-1,3-1,4-1

APROG SolventCorrection_1 r1a1 r1a2 r1a3 r1a4 r1a5 r1a6 r1b1 r1b2

LOOP Screening STEP

APROG Screening %pos %comp %conc %mw

ENDLOOP

APROG SolventCorrection_2 r1c1 r1c2 r1c3 r1c4 r1c5 r1c6 r1d1 r1d2

APPEND standby

END

7.5 SDS-Polyacrylamidgele von PS-II-Proteinkomplexen aus nach der Piletskaya-Methode isolierten Thylakoiden

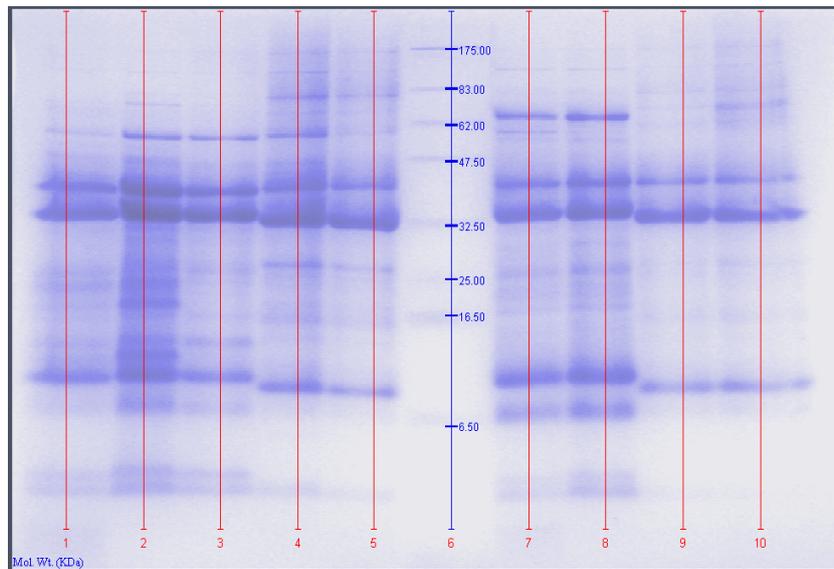


Abb. 7.1: SDS-PAGE von PS-II-Proteinkomplex-Extrakten, die nach der Thylakoidisolationmethode von Piletskaya *et al.* (1997) isoliert wurden. Färbung Coomassie®, Beschriftung: Molekulargewicht der detektierten Banden in kDa, rote Striche und Zahlen: Markierung und Nummerierung der Bahnen.

PS-II-Proteinkomplex-Extrakte von:

Bahn	1	2	3	4	5
Extrakt	PS II 31 E2	PS II 38 E1	PS II 38 E2	PS II 40 K	PS II 40 KL
Bahn	6	7	8	9	10
Extrakt	Marker	PS II 41 BT	PS II 41 B	PS II 42 K	PS II 42 KT

PS II = PS-II-Proteinkomplex-Extrakt, Zahl = Nummer des Extraktes, B = *Vicia faba*, E1 = *Pisum sativum* var. *Feltham first*, E2 = *Pisum sativum* var. *Maiperle*, K = *Lactuca sativa*. L = Anzucht mit künstlicher Zusatzbelichtung, ohne L = Anzucht ohne künstliche Zusatzbelichtung, T = am Ende der Thylakoidisolation in 50 mM Tris pH 8,0 aufgenommene Thylakoide (s. Anhang 7.1).

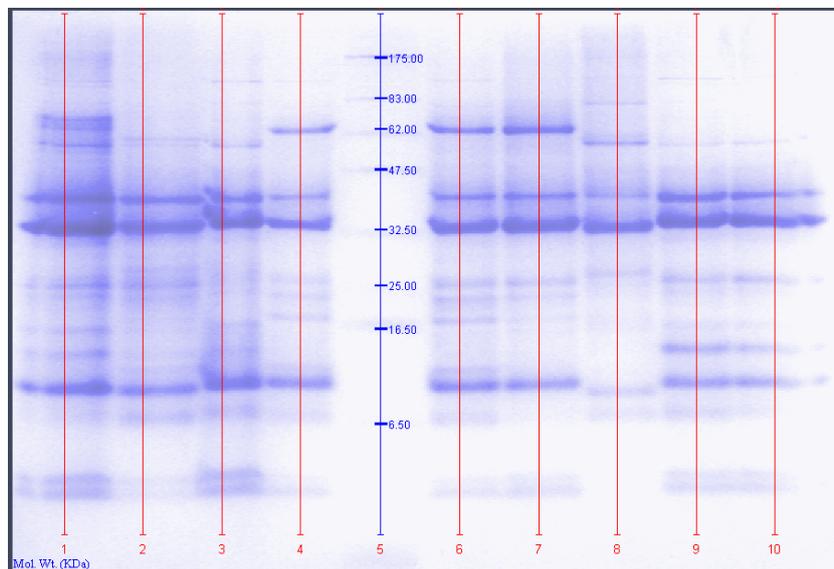


Abb. 7.2: SDS-PAGE von PS-II-Proteinkomplex-Extrakten, die nach der Thylakoidisolationmethode von Piletskaya *et al.* (1997) isoliert wurden. Färbung Coomassie®, Beschriftung: Molekulargewicht der detektierten Banden in kDa, rote Striche und Zahlen: Markierung und Nummerierung der Bahnen.

PS-II-Proteinkomplex-Extrakte von:

Bahn	1	2	3	4	5
Extrakt	PS II 44 E1L	PS II 46 E1L	PS II 47 E1L	PS II 51 B	Marker
Bahn	6	7	8	9	10
Extrakt	PS II 52 B	PS II 53 BL	PS II 54 KL	PS II 55 E1	PS II 56 E2L

PS II = PS-II-Proteinkomplex-Extrakt, Zahl = Nummer des Extraktes, B = *Vicia faba*, E1 = *Pisum sativum* var. *Feltham first*, E2 = *Pisum sativum* var. *Maiperle*, K = *Lactuca sativa*. L = Anzucht mit künstlicher Zusatzbelichtung, ohne L = Anzucht ohne künstliche Zusatzbelichtung (s. Anhang 7.1).

7.6 Übersicht über die verwendeten Thylakoidisolate

Bezeichnung des Thylakoid-extraktes	Datum	Pflanze	Isolations-methode nach	Chloro-phyllgehalt der Thylakoide [$\mu\text{g/ml}$]	Yield der Thylakoide
T SL 4	29.01.03	Spinat	Bassi	452	0,4
T SL 5	30.01.03	Spinat	Bassi	450	0,3
T BL 8	04.02.03	Bohne	Bassi	754	0,19
T B 9	18.02.03	Bohne	Bassi	743	0,3

Tab. 7.4: Übersicht über die verwendeten Thylakoidisolationen:

Angegeben sind das Datum der Isolation, die verwendete Pflanzenspezies und die Isolationsmethode. Ebenfalls ist der Yield sowie der Chlorophyllgehalt ($\mu\text{g/ml}$) der Thylakoide dargestellt.

T = Thylakoidextrakt, Zahl = Nummer der Isolation, B = Bohne, S = Spinat.

Bassi = Thylakoide wurden nach der Methode von Bassi et al. (1985) isoliert.

L = mit künstlicher Zusatzbelichtung angezogene Pflanzen, ohne L = ohne künstliche Zusatzbelichtung angezogene Pflanzen.



8 Chemikalienverzeichnis

Chemikalie

Aceton
 Acetonitril (can), HPLC gradient grade
 Acrylamid 4 K-Lösung (49,5 %) Mix 32:1
 Aminocaprinsäure
 APS (Ammoniumpersulfat),
 für die Molekularbiologie
 Benzamidin
 BIO-RAD PROTEIN ASSAY Dye Reagent
 concentrate
 Bio-Safe™ Coomassie®,
 Coomassie® G 250 Stain
 BSA (Bovine serum albumin =
 Rinderserumalbumin) Fraction V, ≥ 98,0 % (HPCE)
 1-Butanol, für die Flüssigkeitschromatographie
 Coomassie®-Brillantblau R-250
 Cyanurchlorid
 Dichlormethan
 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure (sinapinic acid =
 SA)
 DMSO (Dimethylsulfoxid)
 EDTA (Ethyldiaminotetraessigsäure), BioChemica
 Essigsäure, zur Analyse
 Ethanol 96 %, reinst Ph. Eur. JP. USP
 Ether
 Ethylamin
 Flavinmononukleotid (FMN)
 Glycerin, für die Molekularbiologie
 Gycin, zur Analyse
 Harnstoff, für die Molekularbiologie
 HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-
 sulfonsäure), Pufferqualität
 Hexan
 Horseradish-Peroxidase

Firma

Merck, Darmstadt, D
 Merck, Darmstadt, D
 Applichem, Darmstadt, D
 Sigma-Aldrich, Steinheim, D
 Applichem, Darmstadt, D

 Sigma-Aldrich, Steinheim, D
 BIO-RAD, München, D

 BIO-RAD, München, D

 Fluka, Buchs, CH

 Merck, Darmstadt, D
 Applichem, Darmstadt, D
 Sigma-Aldrich, Steinheim, D
 Sigma-Aldrich, Steinheim, D
 Sigma-Aldrich, Steinheim, D

 Sigma-Aldrich, Steinheim, D
 Applichem, Darmstadt, D
 Merck, Darmstadt, D
 Merck, Darmstadt, D
 Merck, Darmstadt, D
 Sigma-Aldrich, Steinheim, D
 Boehringer, Ingelheim, D
 Applichem, Darmstadt, D
 Merck, Darmstadt, D
 Applichem, Darmstadt, D
 Applichem, Darmstadt, D

 Sigma-Aldrich, Steinheim, D
 Fluka, Buchs, CH

Kaliumhydroxid ≥ 85 % p. a. in Plätzchen	Roth, Karlsruhe, D
LDS (Lithium-Dodecyl-Sulfate)	Applichem, Darmstadt, D
Magermilchpulver	Heierler Cenovis GmbH, Radolfzell, D
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
β -Mercaptoethanol, für die Molekularbiologie	Applichem, Darmstadt, D
Milchpulver, Blotting grade	Roth, Karlsruhe, D
MilliQ grade (Widerstand > 18 Mohm, ELGA Purelab Maxima)	ELGA, Celle, D
N,N-Diisopropylethylamin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Natriumascorbat (L-Ascorbic Acid Sodium Salt)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Natriumchlorid, Baker analyzed	J.T. Baker, Deventer, NL
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
PBS (Phosphate Buffered Saline)-Tabletten, pH 7,46	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
1-Propanol, für die Flüssigkeitschromatographie	Merck, Darmstadt, D
2-Propanol, HPLC grade	Fisher Scientific, Leicestershire, UK
D(+)-Saccharose, für die Molekularbiologie	Applichem, Darmstadt, D
Salzsäure, rauchend 37%	Merck, Darmstadt, D
SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfate), Ultrapure	Applichem, Darmstadt, D
D(-)-Sorbit, reinst für die Molekularbiologie	Merck, Darmstadt, D
D(-)-Sorbit, reinst Ph. Eur, USP	Applichem, Darmstadt, D
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin)	Applichem, Darmstadt, D
Tetrahydrofuransäure (THF)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tricin, Bio Chemica	Applichem, Darmstadt, D
Trifluoressigsäure (TFA) Uvasol®, for spectroscopy	Merck, Darmstadt, D
Tris (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol), für die Molekularbiologie	Applichem, Darmstadt, D
Tris (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol), Pufferqualität	Applichem, Darmstadt, D
Tween©20	Applichem, Darmstadt, D
Biacore-Chemikalien	
BIAdesorb solution 1 und 2	Biacore, Uppsala, S
BIAdisinfektant solution	Biacore, Uppsala, S
BIAnormalizing solution (70 % Glycerol)	Biacore, Uppsala, S
BIAtest solution	Biacore, Uppsala, S

Cystamin-Dihydrochlorid	Biacore, Uppsala, S
L-Cystein	Biacore, Uppsala, S
1,4-Dithioerythritol (DTE)	Biacore, Uppsala, S
Ethanolamin-HCl, 1 M, pH 8,5	Biacore, Uppsala, S
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-Hydrochlorid (EDC)	Biacore, Uppsala, S
HBS-EP-Puffer	Biacore, Uppsala, S
HBS-N-Puffer	Biacore, Uppsala, S
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	Biacore, Uppsala, S
2-(4-Morpholino)-ethanesulfonic acid (MES), 0,1 M, pH 5,0	Biacore, Uppsala, S
PBS-Puffer, 0,1 M	Biacore, Uppsala, S
2-(2-Pyridinyldithio)-ethaneamine hydrochloride (PDEA)	Biacore, Uppsala, S
Sodium acetat, 0,1 M	Biacore, Uppsala, S
Sodium borate, 0,15 M, pH 8,5	Biacore, Uppsala, S
Sodium chloride, 1 M, pH 4,0	Biacore, Uppsala, S
Surfactant P20 (Polysorbate 20) (10 %)	Biacore, Uppsala, S



9 Abkürzungs- und Wortverzeichnis

A	Analyt
A1	„Fitting“-Konstante
A2	„Fitting“-Konstante
AB	Liganden-Analyt-Komplex
AK	Antikörper
Ala	Alanin
analyte recovery	Rückgewinnung eines zuvor an der SPR-Sensorchipoberfläche gebundenen Analyten zur weiteren Analyse
APS	Ammoniumpersulfat
Aq. dest.	Aqua destillata
AS	Aminosäure
Asp	Aspartat
assay	Analyse, Test, Untersuchung
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
AU	Absorption Unit = Absorptionseinheit
Autosampler	Automatischer Probennehmer und -geber
B	<i>Vicia faba</i> = Saubohne
BBY-Membranen	Granathylakoide nach Berthold , Babcock und Yocum isoliert (1981)
BIA	Biomolecular Interaction Analysis
Biacore analyte recovery	Rückgewinnung eines zuvor an der SPR-Sensorchipoberfläche gebundenen Analyten zur weiteren Analyse
Biacore-MS-Kopplung	Kopplung der SPR-Technologie mit der Massenspektrometrie
br	Breit
BSA	Bovine serum albumin = Rinderserumalbumin
C & B	Cohen und Baxter (1990)
C18	Kieselgel mit Octadecylgruppen
C4	Kieselgel mit Butylgruppen
caesar	Center of advanced european studies and research
Carry over	Probenverschleppung
CF ₀ -Untereinheit	Transmembraner Protonenkanal der ATPase, bestehend aus mehreren integralen Membranproteinen (C für Chloroplasten)
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan = Methylenechlorid
Chelation	Bildung von stabilen Komplexen aus organischen Verbindungen mit Metall-Ionen

Chi ²	Fläche zwischen berechnetem („gefittetem“) und gemessenem Sensorgramm
Conc	Konzentration des Analyten (M)
CP	Chlorophyll-bindendes-Protein = Core-Antennen-Protein
Cyt <i>b-559</i>	Cytochrom <i>b-559</i>
D1-Tyr161	Spezieller Aminosäurerest des D1-Proteins der in der Elektronentransportkette ein Elektron vom P680 ⁺ übernimmt
d ⁶	deutert
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCMU	Di-Chlorophenyl-di-Methyl-Urea
DCPIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
DegP2	Protease die die primäre GTP-abhängige (Guanosintriphosphat-abhängige) Spaltung des D1-Proteins im stromalen IV-V-Loop katalysiert
DMSO	Dimethylsulfoxid
„double referencing“ „double referenced“	Beim „double referencing“ wird die bereits von der Referenz-Flusszelle abgezogene Pufferinjektion von der ebenfalls bereits von der Referenz-Flusszelle abgezogenen Probeninjektion subtrahiert
„Docken“	Pressen bzw. Absenken („Docken“) des Sensorchips an den IFC-Flusszellenblock
dpi	Dots per inch
Drift	Basislinien-Drift (RU/s)
DTE	1,4-Dithioerythritol
E	<i>Pisum sativum</i> = Erbse
E1	<i>Pisum sativum</i> var. <i>Feltham first</i>
E2	<i>Pisum sativum</i> var. <i>Maiperle</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
Elektronenkristallographie	Verfahren zur Ermittlung der räumlichen Anordnung der Atome in kristallinen Festkörpern mit Hilfe von Elektronenstrahlen
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESI	Electrospray Ionisation
EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
eV	Elektronen-Volt
Ex	Extinktion
F	Fraktion
FC	Flusszelle
Fe	Eisen

„Fitting“	(Kurven)anpassung
Fm`	Maximale Fluoreszenz bei Lichtsättigung
FMN	Flavinmononukleotid
FPLC	Fast protein liquid chromatography
Ft	Grundfluoreszenz bei Messlicht
FtsH	Metalloendopeptidase
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
His	Histidin
HPLC	High performance liquid chromatography = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Horseradish-Peroxidase
Hz	Hertz = SI-Einheit der Frequenz = Schwingungen/Sekunde
IFC	Integrated μ -Fluidic Cartridge = Mikroflusssystem
Ile	Isoleucin
IMBIO	Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen
J	Kopplungskonstante
K	<i>Lactuca sativa</i> = Kopfsalat
k _a	Assoziations-Ratenkonstante
K _A	Assoziations-Gleichgewichtskonstante
k _d	Dissoziations-Ratenkonstante
K _D	Dissoziations-Gleichgewichtskonstante
„Kinject“	Spezieller Injektionsmodus des Biacore® 3000 für kinetische Messungen
k _{obs}	beobachtete k _a (= k _a * C + k _d)
Konz	Konzentration
Kryo	Gefrier-; bei tiefen Temperaturen
L	Ligand
„Labelling“	Markierung einer Substanz
<i>Lactuca sativa</i>	Kopfsalat
LED	Licht emittierende Diode
Leu	Leucin
LHC II	Light-harvesting complex II
Lhcb	Gene die die Light-harvesting-complex-II-Proteine kodieren

Light-harvesting complex II	Lichtsammler-Komplex = Lichtsammelproteinkomplex des Photosystems II
Linker	Verbindung
Loop	Transmembran-Helices verbindende Kette
m	Multiplett
M	Marker
m. L.	Anzucht der Pflanzen <u>mit</u> künstlicher Zusatzbelichtung
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
MALDI	Matrix assisted laser desorption/ionization = Matrix-untersützte Laserdesorption/Ionisation
MALDI-Platte	Matrix-assisted-laser-desorption/ionization-Platte, Träger auf dem die MALDI-Messungen durchgeführt werden
MDL	Method Definition Language
MES	2-(4-Morpholino)-ethanesulfonic acid
Mg	Molekulargewicht
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
Mn	Mangan-Cluster
MPI	Max-Planck-Institut
MS	Massenspektrometrie
MTP	Micro Titer Plate format
Mw	Mittelwert
MW	Molekulargewicht
MWCO	Molecular weight cut off = Molekulargewichts-Abtrennung
n	Anzahl der Messwerte
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NADPH	Reduzierte Form des NADP
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
negcontrol	Negativ-Kontrolle
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance = Kernmagnetische Resonanz
„normalisieren“	Normalisierung des Resonanzsignals mit 70 %iger Glycerinlösung um geringe Unterschiede zwischen verschiedenen Sensorchips auszugleichen
NTA	Nitrilotriacetic acid
Ø	Mittelwert
o. L.	Anzucht der Pflanzen <u>ohne</u> künstliche Zusatzbelichtung
OEC	Oxygen-evolving complex = wasserspaltender Mn-Protein-Komplex

opto-interface	Dünne Glassplatte mit Polymer-Film-Rücken auf beiden Seiten, die die optische Kopplung zwischen der optischen Einheit des Biacore® 3000 und dem Sensorchip ermöglicht
P	<i>Pisum sativum</i> , Erbse
P20	Surfactant P20 (Polysorbat 20)
P680	Spezielles Chlorophyllpaar des PS II; primärer Elektronendonator des Photosystems II
P680*	Angeregtes P680
P680 ⁺	Radikalkation des P680
PA	Polyacetat
PAM	Puls-Amplituden-Modulation
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDEA	2-(2-Pyridinyldithio)-ethanamin
Pestizid	Schädlingsbekämpfungsmittel = in den Bereichen wo sie zum Schutz von Pflanzen eingesetzt werden nennt man sie auch Pflanzenschutzmittel
PET	Photosynthetischer Elektronentransport
pH	Der mit (-1) multiplizierte Zehnerlogarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
Phä	Phäophytin
Phe	Phenylalanin
„Photodamage“	Lichtschädigung
pI	Isoelektrischer Punkt
<i>Pisum sativum</i>	Erbse
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
potentiometrische Messung	Maßanalytisches Verfahren, bei dem der Verlauf der Titration durch Potentialmessung an der zu bestimmenden Lösung verfolgt wird
POX	Peroxidase
PQ	Plastoquinon
„Prime“	Spülen der IFC, des Sensorchips, der Pumpen und des Autosamplers des Biacore® 3000
PS II	Photosystem II
<i>psbA</i>	<i>ps</i> = Photosystem; <i>b</i> = II; <i>A</i> = 1 Genomische Bezeichnung für das D1-Protein
psi	Pound per square inch = 6894,757293168 Pa; Einheit für den Druck
PS-II-Core-Komplex	Wird vom PS-II-Reaktionszentrum, dem CP47 und CP43 sowie 14 weiteren Proteinen gebildet
PS-II-Herbizide	Herbizide deren Wirkort die Q _B -Bindenische des D1-Proteins im Photosystem II ist
PS-II-Inhibitoren	Substanzen die an die Q _B -Bindenische des D1-Proteins im Photosystem II binden und dadurch den photosynthetischen Elektronentransport in der Thylakoidmembran inhibieren

PS-II-LHC-II-Superkomplex	Photosystem-II-Light-harvesting-complex-II-Superkomplex
PS-II-RC	PS-II-Reaktionszentrum
PS-II-Reaktionszentrum	Das D1-Protein bildet zusammen mit dem D2-Protein, der α - und β -Untereinheit des Cytochroms <i>b-559</i> und dem Protein I das PS-II-Reaktionszentrum
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q _A	Plastochinon A
Q _B	Plastochinon B
QH ₂	Plastochinol = reduzierte Form des Plastochinons
RC	Reaktionszentrum
„Recover“/“Recovery“	zurückgewinnen/Zurückgewinnung
Req	Antwort im Gleichgewicht (50 % R _{max})
R _f -Wert	Quotient der Wanderungsstrecke der einzelnen Analytkomponenten und der Wanderungsstrecke des Laufmittels
R _{hi}	Antwort bei unendlicher Konzentration
RI	Refraktiver Index-Effekt durch den Puffer
R _{lo}	Antwort bei der 0-Konzentration
R _{max}	Maximale Bindungskapazität des Chips
RP	Reversed phase = Umkehrphasen
RP-FPLC	Reversed phase Fast protein liquid chromatography
rpm	rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
S	<i>Spinacea oleracea</i> = Spinat
SA	Sinapinic acid = Sinapinsäure
SDS	sodium dodecyl sulfate = Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SDS-Polyacrylamidgel	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel
SE	Standard-Fehler
Ser	Serin
Simazinderivat	6- {[4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl]amino}-hexansäure
Simazinhexansäure	6- {[4-Chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl]amino}-hexansäure
Solvent-correction-Lösung	Lösungsmittel-Korrektionslösung
Spacer	Zwischenraum, Abstandshalter
SPE	Solid Phase Extraction = Festphasenextraktion
<i>Spinacea oleracea</i>	Spinat
Spot	Messpunkt
SPR	Surface Plasmon Resonance = Oberflächen Plasmon Resonanz
Stabw	Standardabweichung

Startup-Injektionen	Injektionen vor dem Anfang einer Messung um die Chipoberfläche zu „normalisieren“
Surface Prep unit	Einheit zur Immobilisierung von Liganden auf einem Sensorchip außerhalb der IFC
Sy	<i>Synechococcus</i> sp.
t	Zeit (s)
t (in der NMR-Spektroskopie)	Triplet
T	Am Ende der Thylakoidisolation in 50 mM Tris pH 8,0 aufgenommene Thylakoide
Ta	Tabak = <i>Nicotiana tabacum</i>
TBS	Tris buffered saline = mit Tris gepufferter Puffer
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuransäure
TIR	Totale interne Reflektion
TKS 1	Torfkultursubstrat Typ 1
TOF	Time of Flight
tOn	Startzeit für die Probeninjektion (s)
Total-Herbizid	Herbizid das jeglichen Pflanzenwuchs vernichtet
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
Triton X-100	Nicht-ionisches Detergens
Tyr	Tyrosin
UE	Untereinheit
UV	Ultraviolett
Val	Valin
Vf	Verdünnungsfaktor
<i>Vicia faba</i>	Saubohne
Wasser-Plastochinon-Oxidoreduktase	Photosystem II
Western-Blotting	Proteinblotting = Auftrennung von Proteinen und nachfolgende Immundetektion
Xenobiotika	In einem ökologischen System normalerweise nicht vorkommende Substanzen (Insektizide, Fungizide, Herbizide, Waschmittel, Pharmaka u. a.)
Yield	Messgröße welche die Aktivität des photosynthetischen Elektronentransportes angibt
Y _Z	Aminosäurerest Tyrosin 161 des D1-Proteins
α -UE Cyt <i>b</i> -559	α -Untereinheit des Cytochroms <i>b</i> -559
δ	Chemische Verschiebung

Danksagung

Für die vielfältige Unterstützung und Hilfe bei meiner Arbeit möchte ich mich bedanken bei:

- Frau Prof. Dr. H. Schnabl für die Überlassung dieses sehr innovativen und herausragenden Themas und für Ihr Vertrauen in mich und meine Arbeit.
- Herrn Prof. Dr. D. Volkmann dafür, dass er seine Freizeit opfert, um das Korreferat dieser Arbeit zu übernehmen.
- Herrn Prof. Dr. S. F. Perry für die freundliche Bereitschaft zur Übernahme des Amtes des fachnahen Mitglieds der Promotionskommission.
- Herrn Prof. Dr. H. G. Sahl für die freundliche Bereitschaft zur Übernahme des Amtes des fachangrenzenden Mitglieds der Promotionskommission.
- Herrn Dr. Jürgen Gandraß und Herrn Dr. Olaf Heemken vom GKSS-Forschungszentrum Geesthacht, Institut für Küstenforschung, für die produktive Zusammenarbeit im Rahmen des D1-Protein-Herbizid-Projektes. Und für die vielen immer wieder schönen nordischen Kooperationstreffen, die viel Spaß gemacht haben.
- Herrn Stefan Jaeger vom Institut für Biochemie der Universität Bonn, Abteilung Prof. Famulok, für die Hilfestellungen und die leihweise Überlassung der Geräte für die Synthese des Simazinderivates sowie für die durchgeführten NMR-spektroskopischen Messungen des Derivates.
- Herrn Dr. Dario Leister vom Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe die Techniken der 2D-Gelelektrophorese und des Western-Blottings zu erlernen.
- Herrn Dr. Paolo Pesaresi vom Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, für die Zeit, die er dafür erübrigt hat, mich die Methoden der 2D-Gelelektrophorese und des Western-Blottings zu lehren, sowie für die vielen Tipps und Kniffe.
- Herrn Dr. Gerhard Treitz von der Arbeitsgruppe Functional peptides des caesar-Forschungszentrums, für die gute Kooperation bei den Messungen zur Biacore-MS-Kopplung sowie für die vielen gewissenhaft durchgeführten Massenspektrometrie-Messungen.
- Herrn Dr. Martin Zabe von der Arbeitsgruppe Functional peptides des caesar-Forschungszentrums, für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei der Biacore-MS-Kopplung und für die mir zur Verfügung gestellten Messzeiten am Massenspektrometer.
- Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen für eine schöne Zusammenarbeit und für ihre Motivationshilfen.
- Meinen Kollegen von caesar für die gute Zusammenarbeit und für die konstruktiven fachlichen Diskussionen.

- Ellen für die jahrelange Freundschaft und schöne Zusammenarbeit.
- Meinem Patenonkel für die gewissenhafte Rechtschreibkorrektur meiner Arbeit und seinen unermüdlichen Einsatz.
- Yvonna und Volker für ihre Hilfe und für ihr gutes Essen, das dafür gesorgt hat, dass ich in der Zeit des Schreibens nicht verhungert bin.
- Bärbel für ihre Hilfe und dafür, dass sie immer an mich gedacht und mich mit Anrufen und SMS aufgemuntert hat.
- Meiner Schwester, die immer an mich geglaubt hat, mir immer wieder Mut gemacht und mich aufgebaut hat. Ich möchte mich bei Ihr für ihre große Hilfe, ihre Ideen und Unterstützung bedanken. Danke, dass du immer für mich da bist. Für die beste kleine Schwester der Welt.
- Meiner Mutter, die mir diesen Lebens- und Ausbildungsweg erst ermöglicht, mir immer wieder Mut gemacht und mich unterstützt hat, diesen Weg zu gehen. Danke, dass du in allen Lebenslagen für mich da bist. Für die beste Mutter der Welt.
- Oliver dafür, dass er immer für mich da war und mich auf jede Art und Weise unterstützt hat. Danke, dass du egal was passiert immer für mich da bist.
- Besonderer Dank gilt auch all den Personen, die hier nicht erwähnt sind, die mich während meiner Arbeit unterstützt und immer an mich geglaubt haben.
- Diese Arbeit wurde unter dem Projektnamen „Pflanzliche Membranthylakoide als Träger der Zielstruktur zur Kopplung von Herbiziden: Analyse des D1-Protein-Herbizid-Komplexes“ mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) unter dem Förderkennzeichen 02WU0328 gefördert.

Hiermit versichere ich, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbst und ohne jede unerlaubte Hilfe angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt sowie alle Stellen der Arbeit, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, kenntlich gemacht habe; dass diese Arbeit noch keiner anderen Stelle als Dissertation eingereicht worden ist; und dass sie abgesehen von der unten angeführten Teilpublikation noch nicht veröffentlicht worden ist.

Bonn, den

Carmen Schulten

Auszüge der Dissertation wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Schulten C., Friebe A., Brandt A., Muktiono B. und Schnabl H. (2005): Characterization of thylakoid membranes and PSII extracts isolated from different plant species. In: Est A. van der und Bruce D. (Eds.): Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives, Proceedings of the 13th International congress on Photosynthesis. International Society of Photosynthesis, Montreal: 269-272.