

*Resonanz-Ramanspektroskopie
an Carotinoiden in Algen
zur Bestimmung der
Kinetik des Violaxanthinzyklus*

Dipl.-Phys. Matthias Koch

22. August 2018



Optical Technologies.

Einführung

Ramanspektroskopie

Biologische Grundlagen

Spektroskopischer Zugang zum Violaxanthinzyklus

Material und Methoden

Anforderungen an die Ramanspektroskopie

Anforderungen an das Modellsystem

Anzucht der Algen

Aufbau des Kinetikexperimentes

Signalverarbeitung

Rohdaten

Chlorophyllfluoreszenz

Wellenlängenkalibration

Grundlinienkorrektur

Ramanlinien der Carotinoide

Messergebnisse

Hell-Dunkel-Rythmen

Untersuchung der Linienlagen

Hauptkomponentenzerlegung

Kinetik des Violaxanthinzyklus

Zusammenfassung und Ausblick

Laserspektroskopischer Zugang zum Violaxanthinzyklus

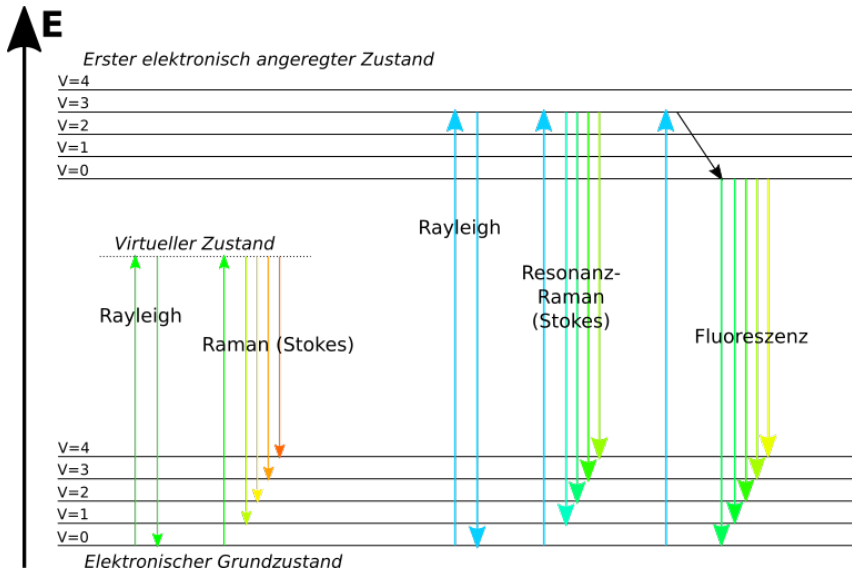
- ▶ Wahl eines geeigneten Modellsystems
- ▶ Resonanz-Ramanspektroskopie
- ▶ Neuartige Signalverarbeitung

Violaxanthinzyklus?

Überlastungsschutz- und Regelmechanismus
in Grünalgen und alle höheren Pflanzen:
“Von der Alge bis zum Baum”

Motivation:

- ▶ Methodenentwicklung für die botanische Grundlagenforschung
- ▶ Erprobung der Stresstoleranz verschiedener Arten
- ▶ Neuer Selektionsfaktor für die Pflanzenzüchtung
- ▶ Schutz vor Licht- und Trockenstress im Zuge des Klimawandels



$$I_S \sim n \omega_S^4 |\boldsymbol{\alpha} * \vec{E}|^2 \quad (1)$$

$$(\alpha_{\rho\sigma})_{fi} = \frac{1}{\hbar} \sum_{r \neq i, f} \left\{ \frac{\langle f | \hat{p}_\rho | r \rangle \langle r | \hat{p}_\sigma | i \rangle}{\omega_{ri} - \omega_1 - i\Gamma_r} + \frac{\langle f | \hat{p}_\sigma | r \rangle \langle r | \hat{p}_\rho | i \rangle}{\omega_{rf} + \omega_1 + i\Gamma_r} \right\} \quad (2)$$

$$\hbar \omega_S = \hbar (\omega_1 - \omega_{fi}) \quad (3)$$

$$\Delta \tilde{\nu} := \frac{1}{\lambda_1} - \frac{1}{\lambda_S} = \frac{\omega_1}{2\pi c_0} - \frac{\omega_S}{2\pi c_0} = \frac{1}{2\pi c_0} * (\omega_1 - \omega_S) = \frac{1}{2\pi c_0} \omega_{fi} = \frac{E_{fi}}{\hbar c_0} \quad (4)$$

I_S	Streuintensität	$ i\rangle$	Anfangszustand
n	Anzahl der schwingenden Dipole	$ f\rangle$	Endzustand
ω_S	Frequenz des gestreuten Lichts	$ r\rangle$	Zwischenzustand
$\boldsymbol{\alpha}$	Tensor der Polarisierbarkeit	Γ_r	Spektrale Halbwertsbreite
\vec{E}	Elektrischer Anregungsfeldvektor	$\hbar \omega_i$	Energie des Anfangszustandes
λ_1	Wellenlänge der Anregungsphotonen	$\hbar \omega_f$	Energie des Endzustandes
λ_S	Wellenlänge der gestreuten Photonen	$\hbar \omega_r$	Energie des Zwischenzustandes
$\hbar \omega_1$	Energie der gestreuten Photonen	$\hbar \omega_1$	Energie der Anregungsphotonen

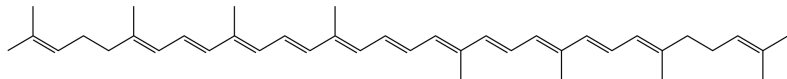
Quelle: Long, "The Raman Effect -

A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules", 2002

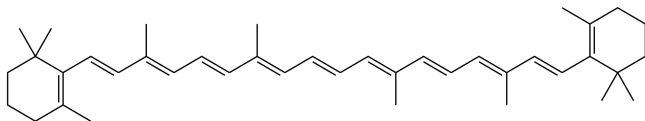
5 Was sind Carotinoide?

- ▶ Farbstoffe mit vielfältigen biologischen Funktionen
- ▶ Polyen-Grundgerüst variabler Länge
- ▶ Verschiedene Endgruppen

Lycopin "Tomatenrot":



β -Carotin "Mohrrübenorange":

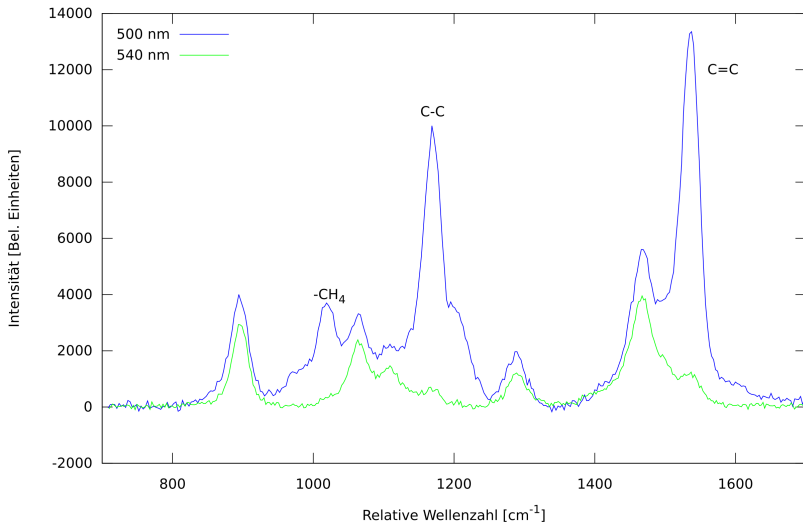


Quellen, abgerufen am 18. August 2018:

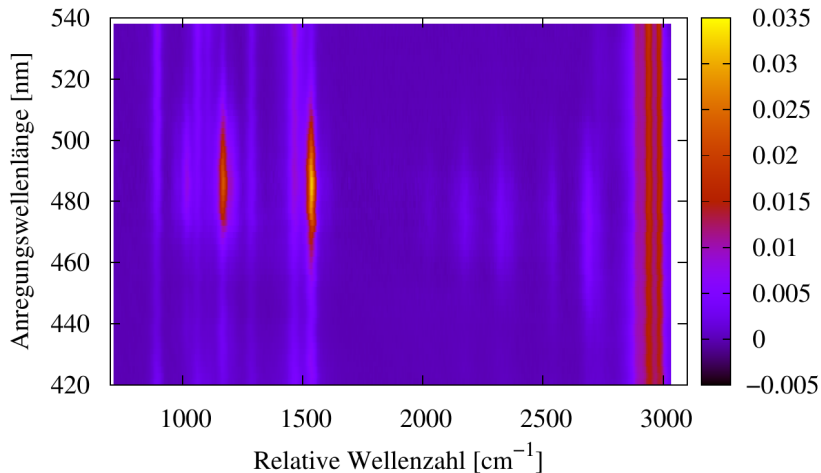
<https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Lycopene.svg>

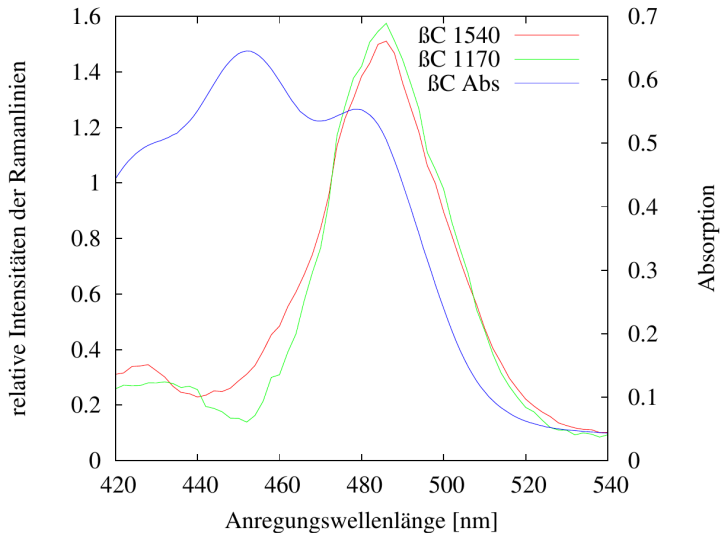
<https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Beta-Carotin.svg>

6 β -Carotin in Ethanol

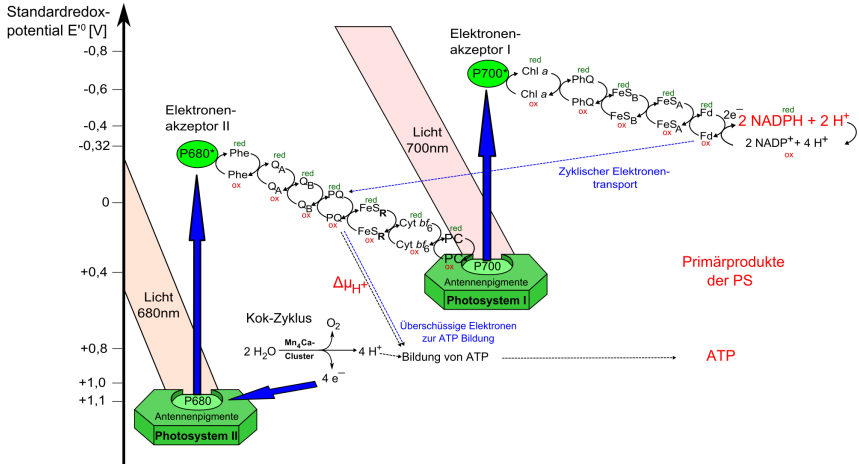


7 Resonanzkarte von β -Carotin in Ethanol





Funktionsweise des Photosystems



Quelle, abgerufen am 18. August 2018:

<https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Lichtreaktion-z-schema.svg>

Carotinoide und Chlorophylle im Photosystem absorbieren Licht
↔ Protonen + “Energieübertrager”

- ▶ Photochemische Reaktionen
- ▶ Abstrahlung als dunkelrote Chlorophyllfluoreszenz
- ▶ Abstrahlung als Wärme

pH-Wert steuert Enzyme für Umwandlung Violaxanthin \rightleftharpoons Zeaxanthin

- ▶ Violaxanthin hilft, Licht zu sammeln
- ▶ Zeaxanthin übernimmt Energie und strahlt Wärme ab

Ziel dieser Arbeit:

Zeitlichen Verlauf der Konzentrationen Violaxanthin/Zeaxanthin
in vivo bestimmen

1931: Regelmechanismen in der Chlorophyllfluoreszenz entdeckt
Kautsky, Hirsch: "Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation"

1932: Violaxanthin & Zeaxanthin bekannt, ihre Rolle noch nicht
Karrer, Helfenstein: "Plant Pigments"

1952: Zeaxanthinakkumulation bei starkem Licht und tiefen
Temperaturen → Carotinoide spielen vermutlich eine chemische Rolle
im Metabolismus von Blättern

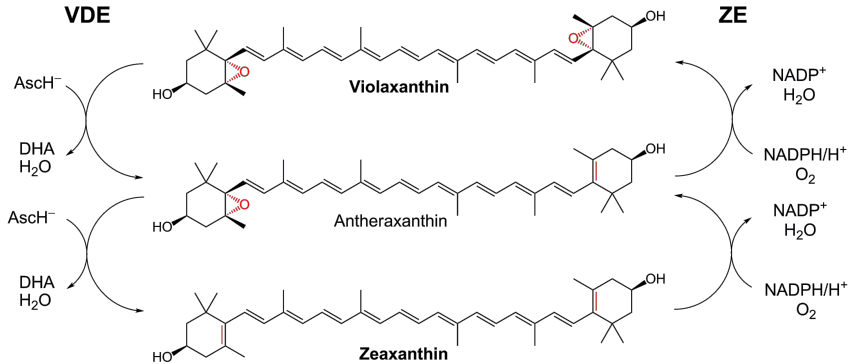
Moster, Quackenbush: "The effects of temperature and light on the carotenoids of seedlings
grown from three corn hybrids"

1959: Violaxanthinkonzentration ändert sich mit dem Lichteinfall,
Diskussion verschiedener Mechanismen

Blass *et al.*: "Biosynthesis and Possible Functional Relationships Among the Carotenoids; and
Between Chlorophyll a and Chlorophyll b"

1967: Antheraxanthin als Zwischenschritt bestätigt

Hager: "Studies on the backward-reactions in the xanthophyll-cycle of Chlorella, Spinacia and
Taxus"

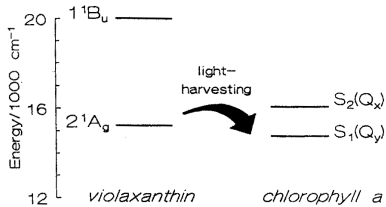


Quelle, abgerufen am 11. August 2018:

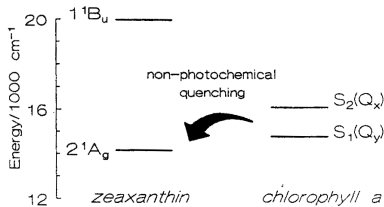
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Violaxanthin_cycle.png (modifiziert)

Funktionsweise des Violaxanthinzyklus

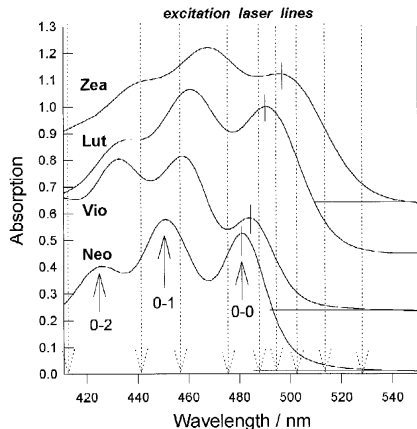
"Molecular Gear Shift" Mechanism
Forward Energy Transfer



Reverse Energy Transfer



Quelle: Frank et al., "Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis", 1994



Unterschiedliche
Resonanzbedingungen:

- ▶ Violaxanthin bei 488,0 nm
- ▶ Zeaxanthin oberhalb von 500 nm: 501,7 nm, 514,5 nm und 528,7 nm

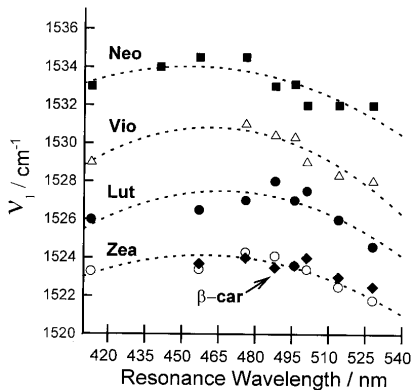
Quelle: Ruban *et al.*, "Configuration and dynamics of xanthophylls in light-harvesting antennae of higher plants: Spectroscopic analysis of isolated light-harvesting complex of photosystem II and thylakoid membranes", 2001 (modifiziert)

- ▶ 45-60 Minuten Messdauer
- ▶ Mehrere Tiefpasskantenfilter
- ▶ Sehr hohe Anforderungen an die Energiekalibration

Anwendungsmöglichkeiten:

- ▶ Resonanzkarten
- ▶ Bestimmung von Resonanzprofilen
- ▶ Verfolgung der Synthese sekundärer Carotinoide

Koch et al., "In vivo determination of carotenoid resonance excitation profiles of *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, and *Porphyridium purpureum*", Journal of Raman Spectroscopy, 2018



Unterschiedliche Linienlagen in Pyridin @ 473 nm:

- ▶ Violaxanthin: 1529 cm^{-1}
- ▶ Zeaxanthin: 1522 cm^{-1}

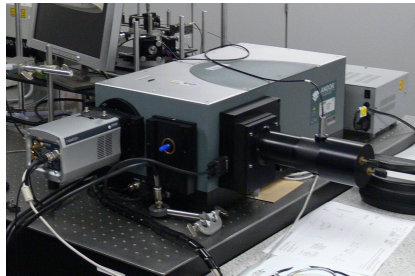
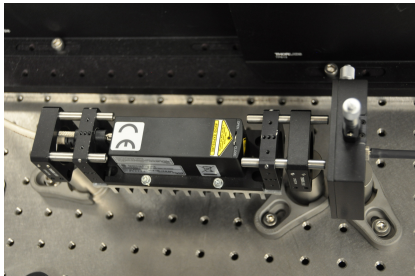
Quelle: Ruban *et al.*, "Configuration and dynamics of xanthophylls in light-harvesting antennae of higher plants: Spectroscopic analysis of isolated light-harvesting complex of photosystem II and thylakoid membranes", 2001 (modifiziert)

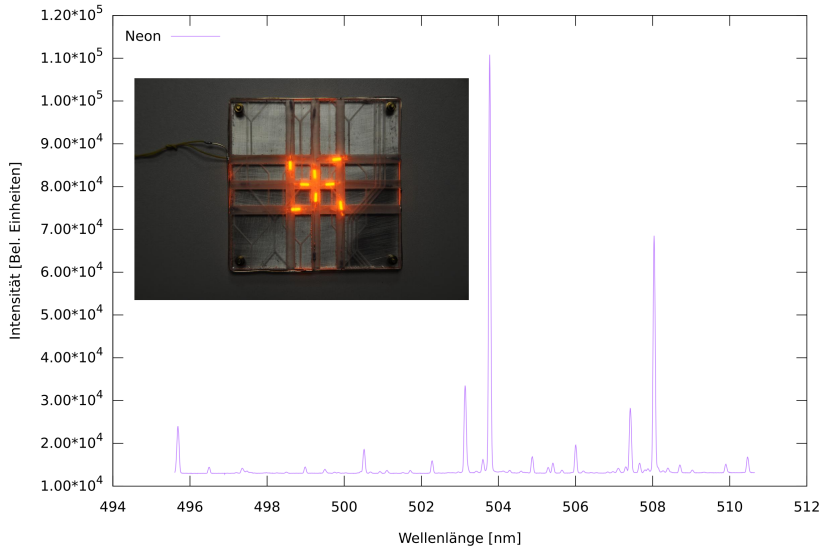
Material und Methoden

- ▶ Resonanzanregung
 - ▶ Blauer Laser
- ▶ Langzeitmessungen von mehreren Tagen
 - ▶ Energiestabilisation des Lasers
- ▶ Linienlagenverschiebung von 1522 cm^{-1} bis 1529 cm^{-1} (182 pm @ 473 nm)
 - ▶ Frequenzstabilisation des Lasers
 - ▶ Linienbreite des Lasers $< 1\text{ cm}^{-1}$ (26 pm)
 - ▶ Offsetkorrektur des Spektrometers besser als 1 cm^{-1} (26 pm)
 - ▶ Langzeitstabilität des Spektrometers

Geräte für die Ramanspektroskopie

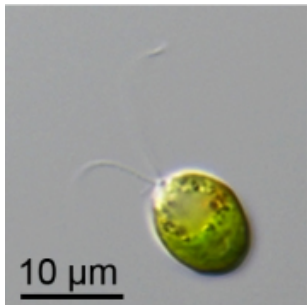
- ▶ Blauer Dauerstrichlaser, 473 nm, 50 mW, 12 pm, energie- und frequenzstabilisiert
- ▶ Faserbündel
- ▶ Tiefpasskantenfilter 473 nm
- ▶ Spektrometer, $\sim 0,8 \text{ cm}^{-1}/\text{Pixel}$ oder $\sim 0,3 \text{ cm}^{-1}/\text{Pixel}$ je nach Gitter





- ▶ Violaxanthinzyklus
- ▶ Viele Individuen → Klein
- ▶ Leicht zu kultivieren
- ▶ Schnelle Vermehrung

- ▶ Göttinger Sammlung von Algenkulturen (SAG 184.80)
- ▶ Besitzt als Grünalge den Violaxanthinzyklus
- ▶ Extrem ausgeprägte Salztoleranz → Erleichtert die Kulturführung
- ▶ Synthetisiert unter Stress β -Carotin als sekundäres Carotinoid

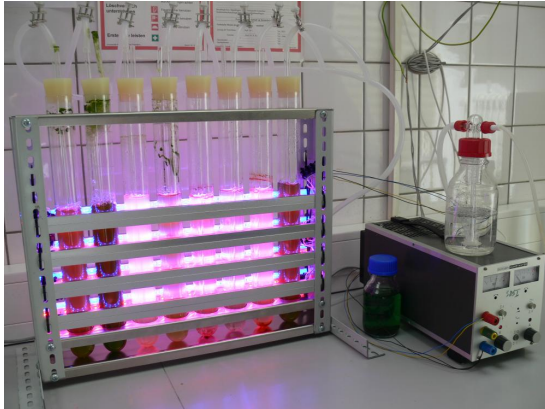


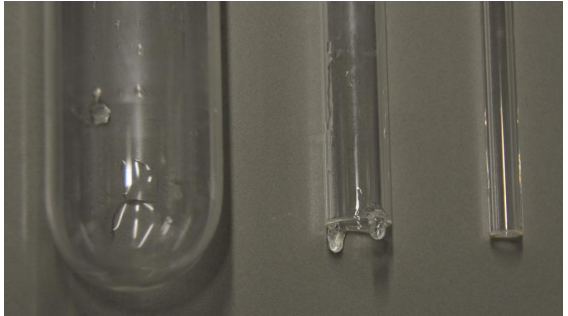
Quelle, abgerufen am 11. August 2018:

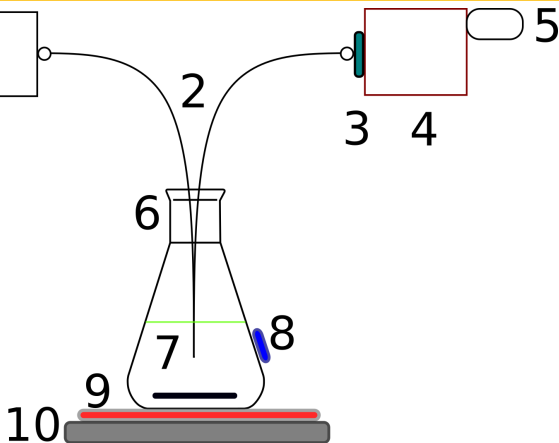
https://sagdb.uni-goettingen.de/detailedList.php?str_number=184.80 (modifiziert)

- ▶ Temperatur 22°C
- ▶ Lichtintensität $2,5 \mu\text{mol} * \text{s}^{-1} * \text{m}^{-2}$ photosynthetisch aktiver Strahlung (400 nm - 700 nm)
- ▶ Kontinuierliche, schonende Belüftung und Umwälzung
- ▶ Definierte Nährstoffzusammensetzung

- ▶ Betrieb mit Pressluft
- ▶ Gaswaschflasche zum Befeuchten der Luft
- ▶ Sterilfilter zur Vermeidung von Kontaminationen
- ▶ Schonende Umwälzung der Kultur nach dem Mammutpumpenprinzip

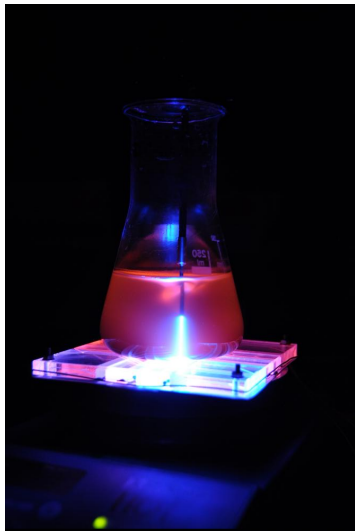




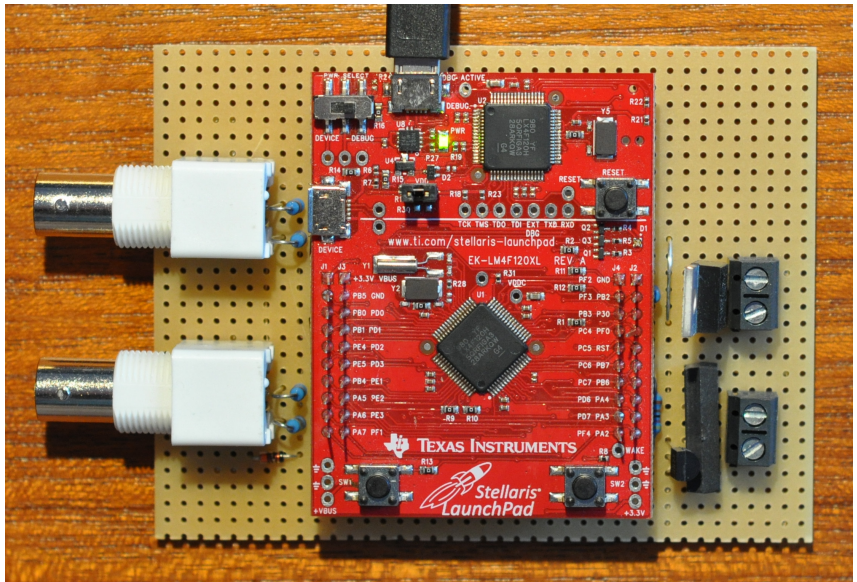


- 1: Blauer Laser
- 2: Faserbündel
- 3: Tiefpasskantenfilter
- 4: Spektrometer
- 5: Kamera

- 6: Glaskolben
- 7: Algenkultur
- 8: LED-Scheinwerfer
- 9: Neonglimmlampen
- 10: Magnetrührer

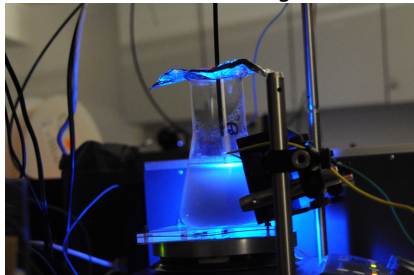


- ▶ Faserbündel für die Ramanspektroskopie
- ▶ 250 ml Erlenmeyerkolben mit 200 ml Algenkultur
- ▶ Plexiglasplatte mit Neonglimmlampen für die Wellenlängenkalibration
- ▶ Magnetrührer

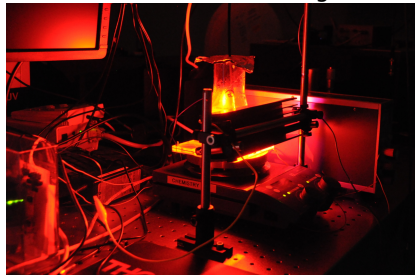


Rote und blaue Hochleistungsleuchtdioden für
 $3000 \mu\text{mol} * \text{s}^{-1} * \text{m}^{-2}$ photosynthetisch aktiver Strahlung
an der Oberfläche des Erlenmeyerkolbens

Ohne Stressbeleuchtung:

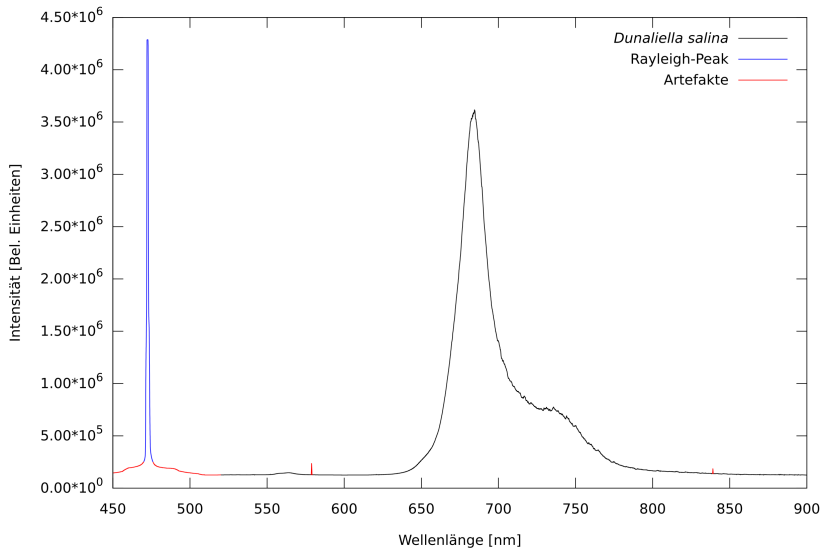


Mit roter Stressbeleuchtung:

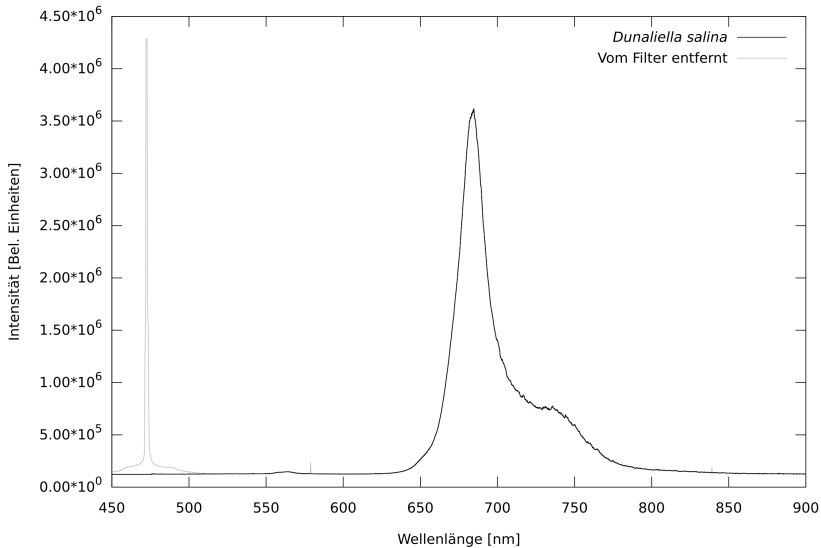


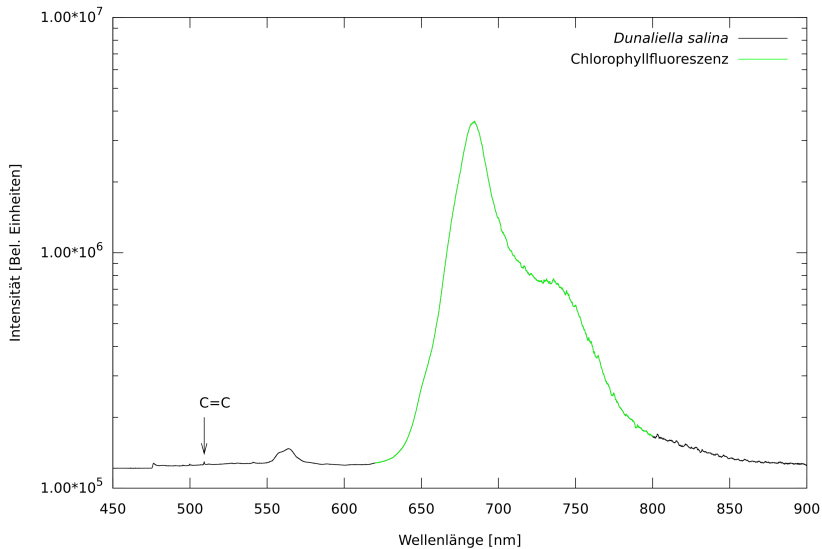
Signalverarbeitung

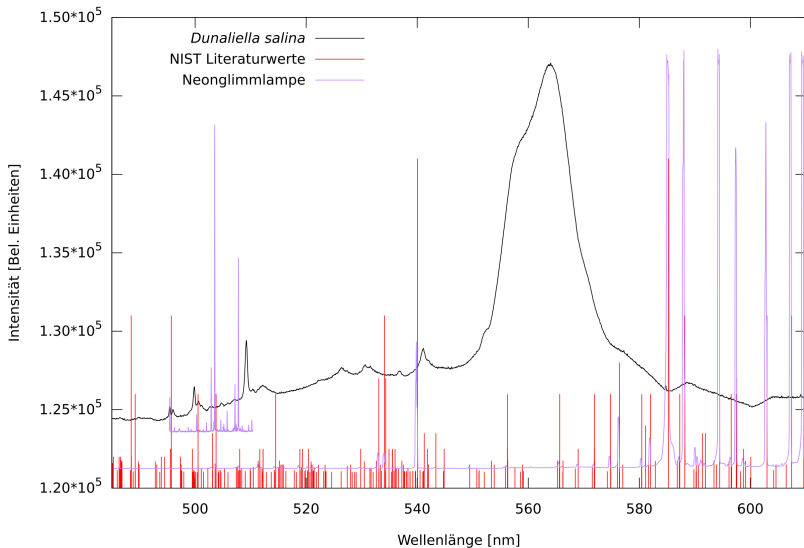
31 *Ungefiltertes Rohspektrum*



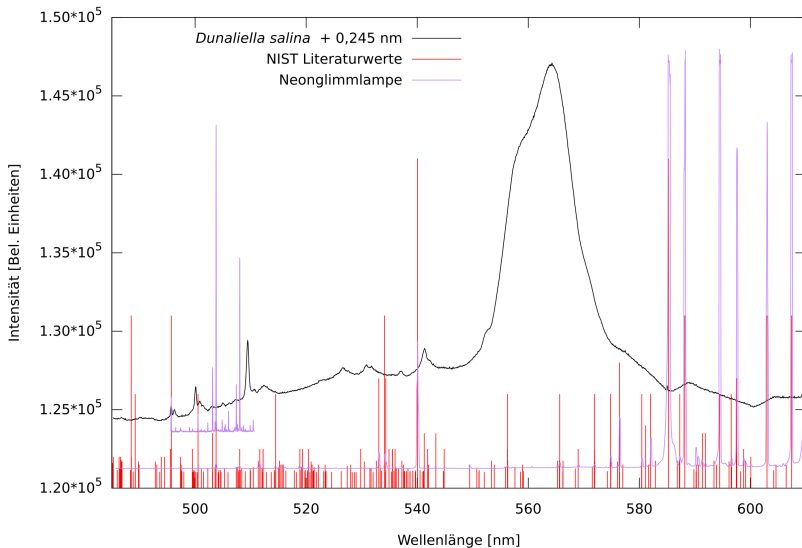
Rohspektrum mit Rayleighfilter

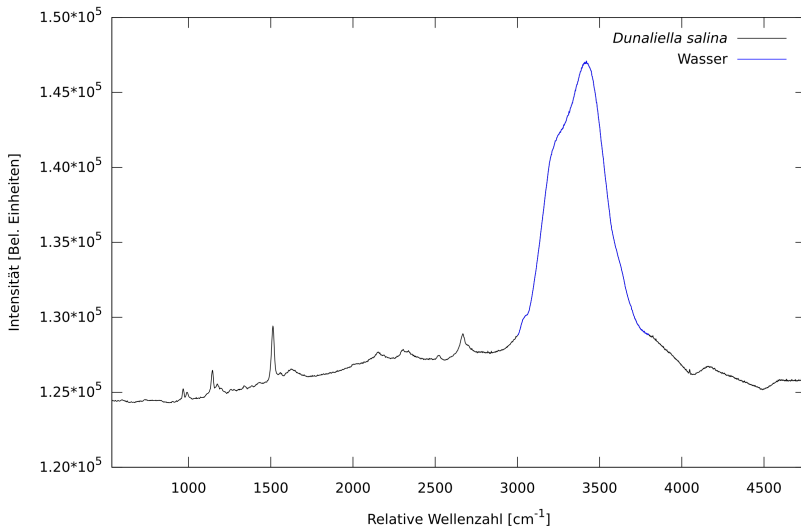




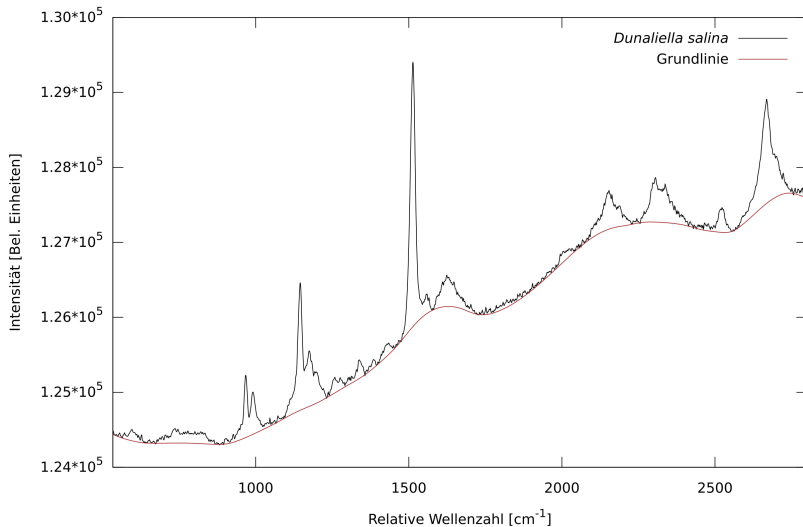


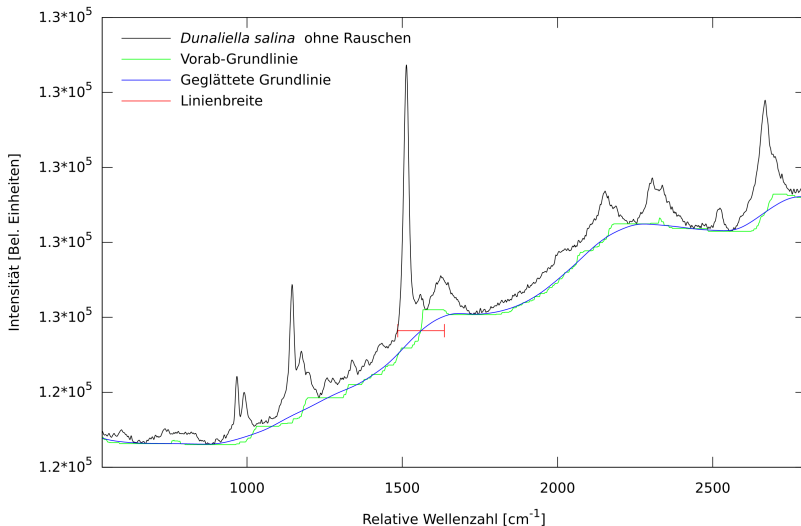
35 Auf die Neonlinien kalibriert



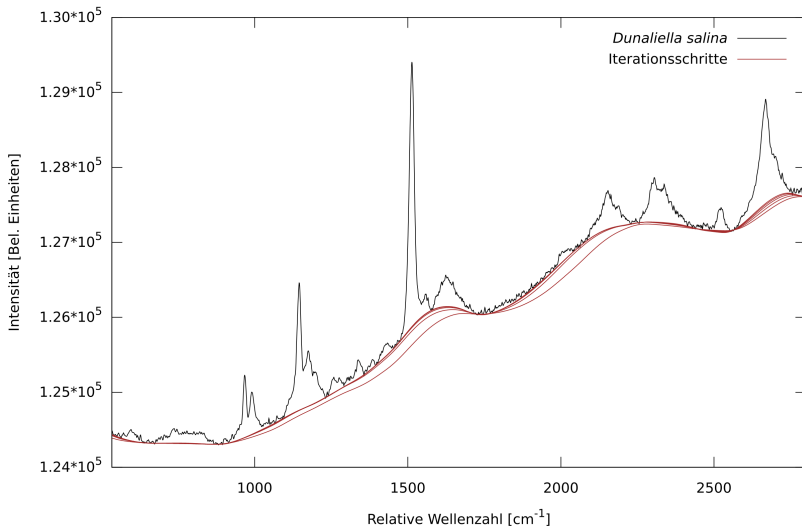


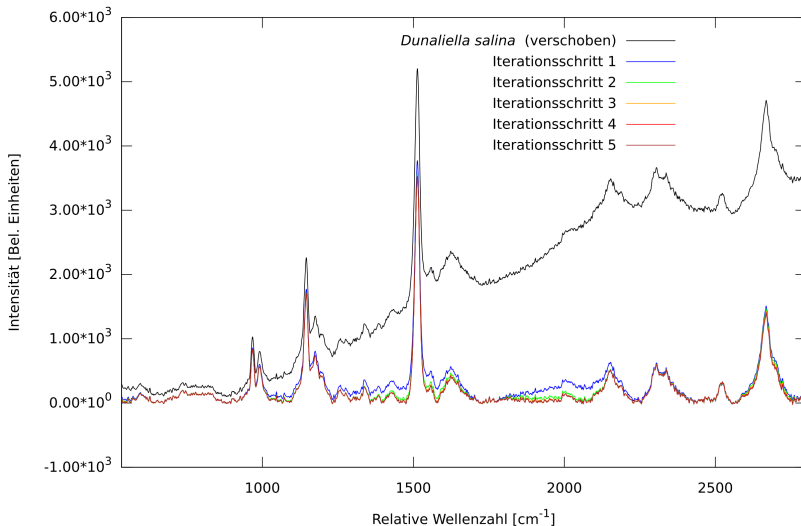
Kompliziert geformte Grundlinie

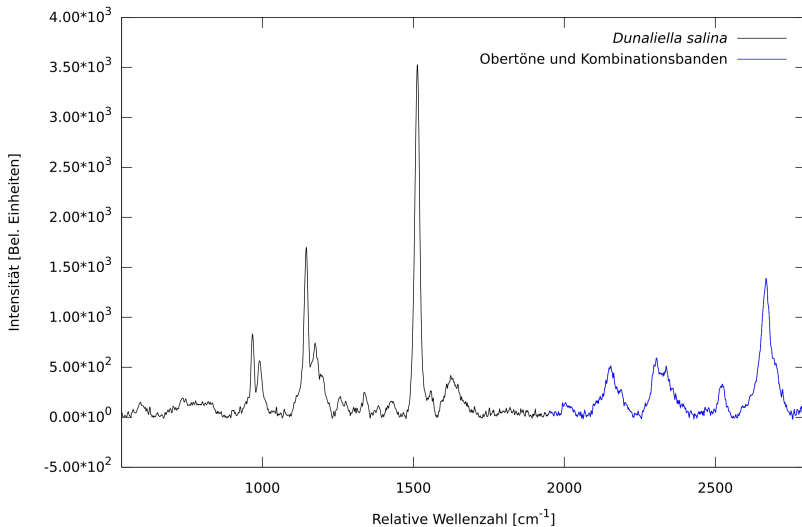


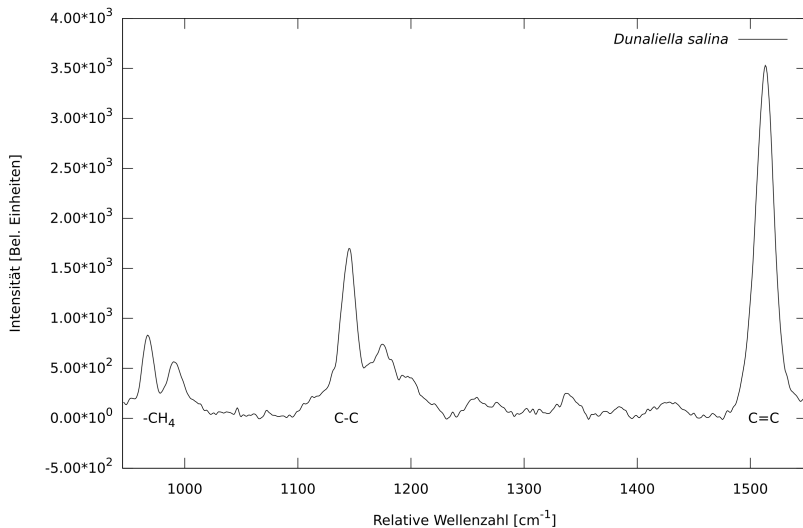


Koch et al., "Iterative morphological and mollifier-based baseline correction for Raman spectra", Journal of Raman Spectroscopy, 2017



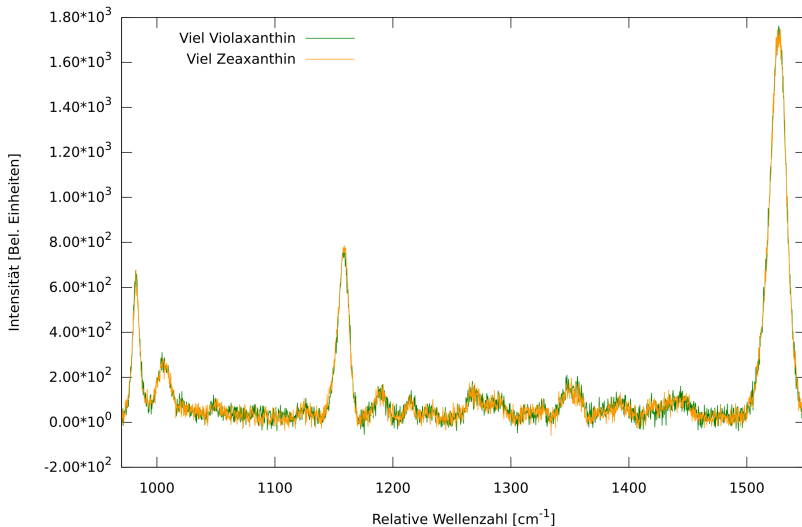


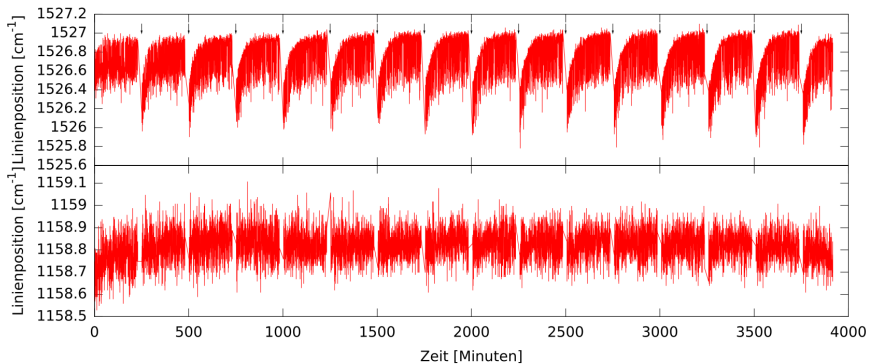




Messergebnisse

Stressbeleuchtung	Farbe	Dunkelphase
42 min	Blau	459 min
42 min	Blau	230 min
73 min (42s an, 21s aus)	Rot	459 min





“Hauptachsentransformation mit Rauschen”

$$D = CS^T + E \quad (5)$$

D Gemessene Spektren

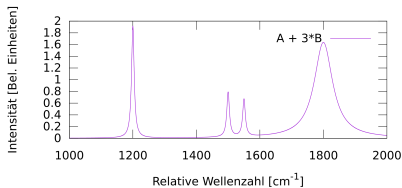
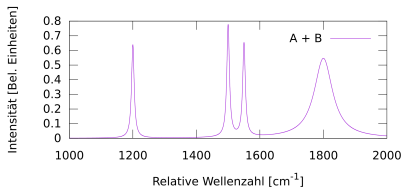
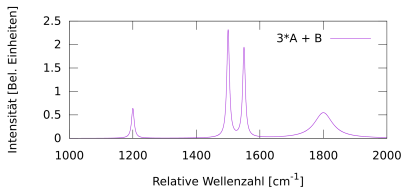
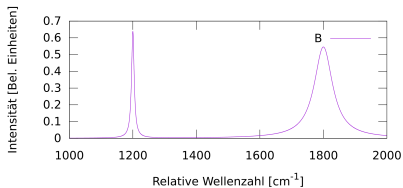
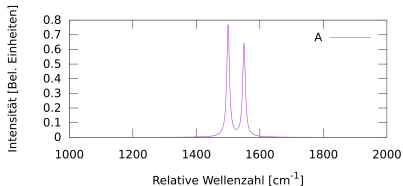
C Konzentrationen der Komponenten

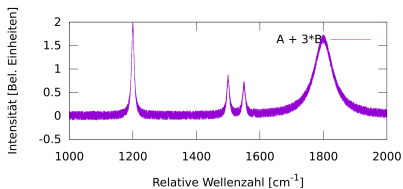
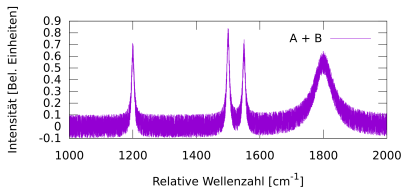
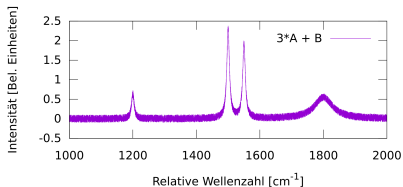
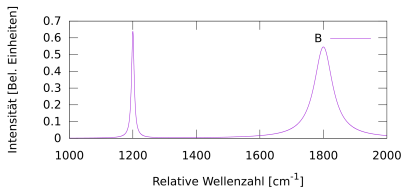
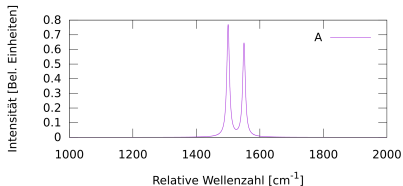
T Transposition

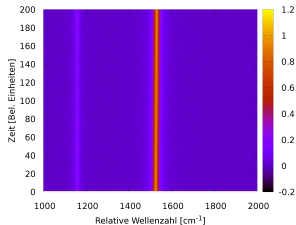
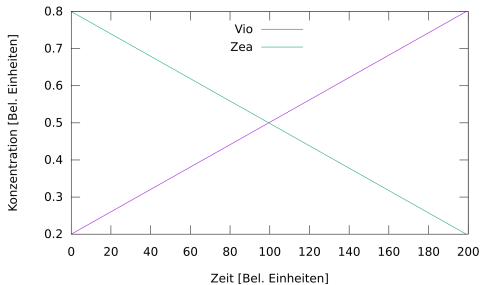
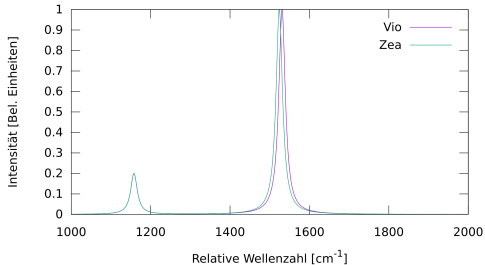
S Spektren der Komponenten

E Nicht als Linearkombination darstellbare Anteile

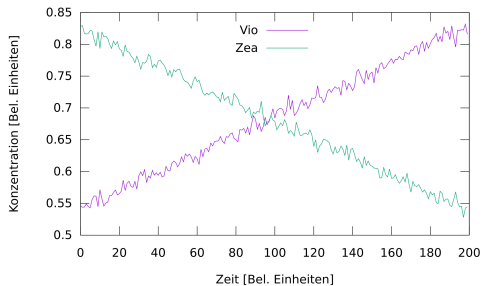
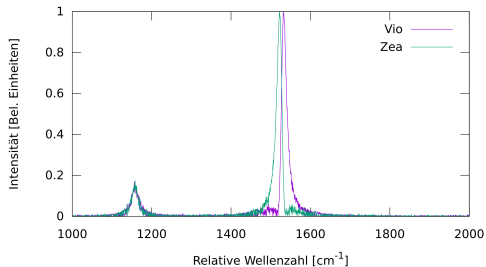
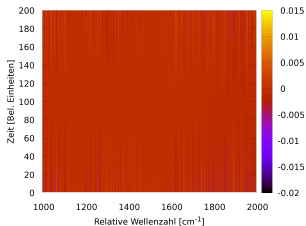
- ▶ Näherungsverfahren
- ▶ Benötigt viel mehr Spektren als Komponenten
- ▶ Mittelt Rauschen aus
- ▶ Zahl der Komponenten wird vorgegeben
- ▶ Sehr objektiv

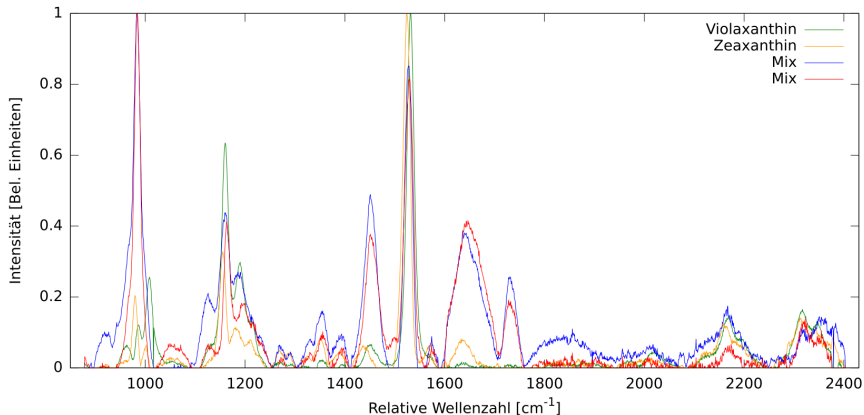




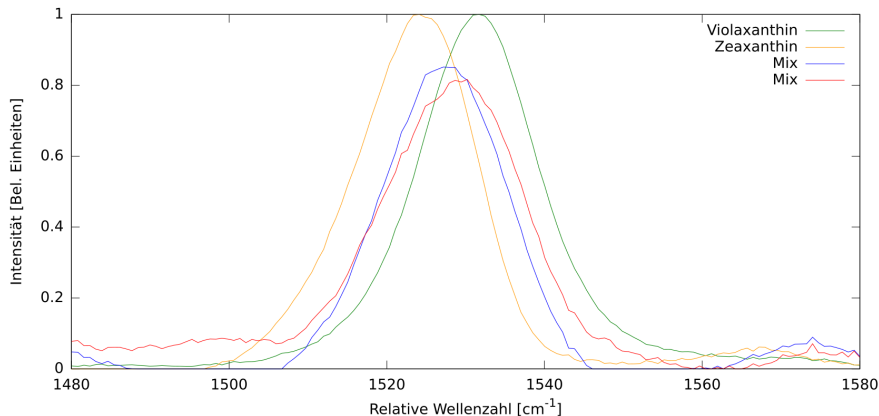


51 Zerlegung einer Linienverschiebung

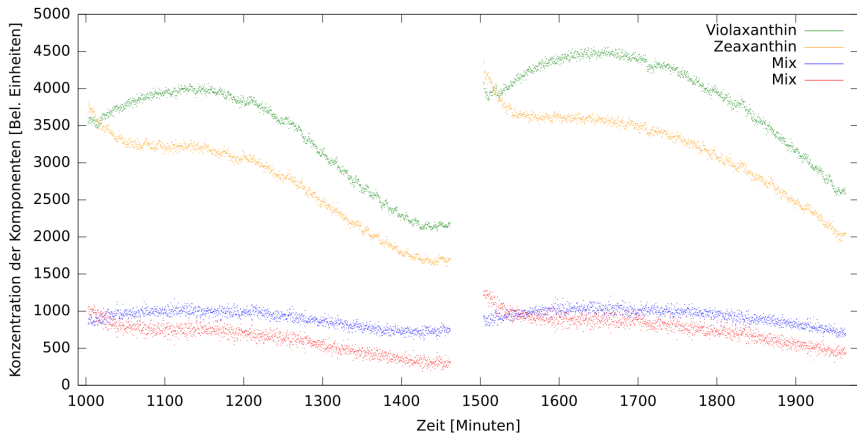




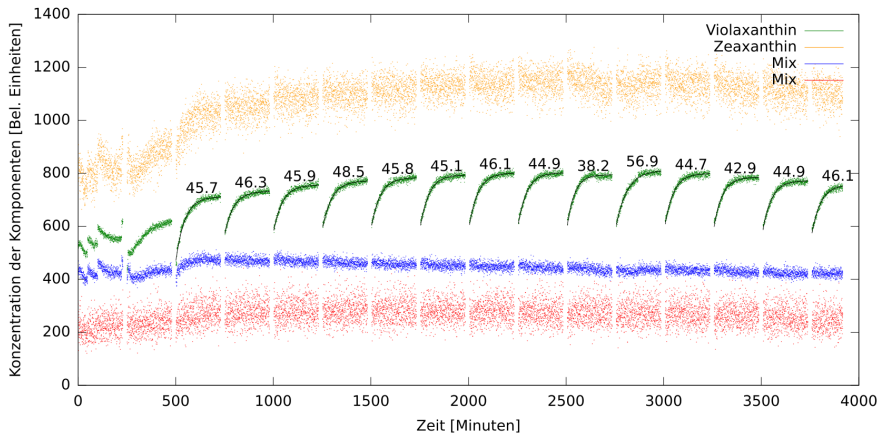
Koch et al., "Violaxanthin cycle kinetics analysed in vivo with resonance Raman spectroscopy",
Journal of Raman Spectroscopy, 2017



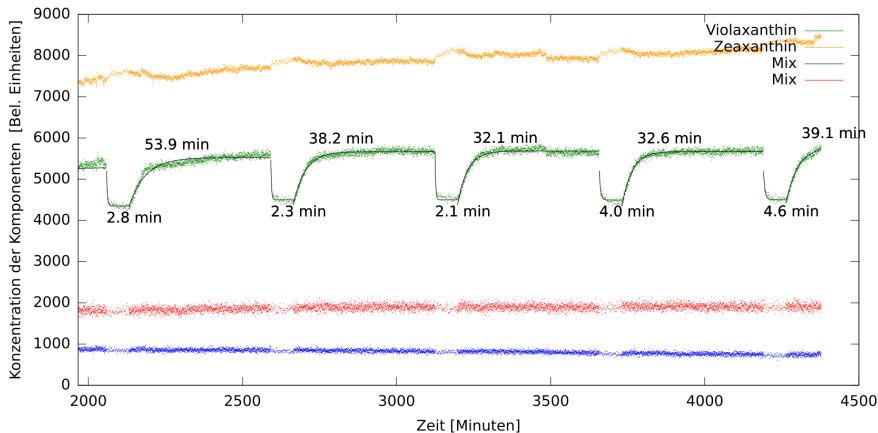
Koch et al., "Violaxanthin cycle kinetics analysed in vivo with resonance Raman spectroscopy",
Journal of Raman Spectroscopy, 2017



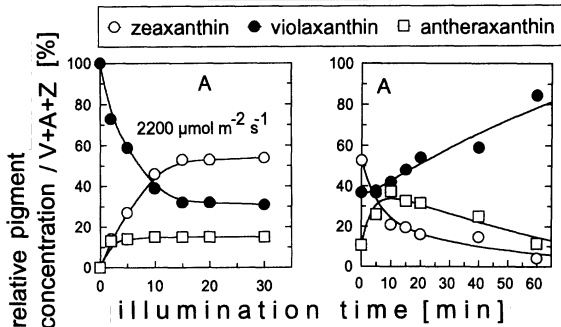
Koch et al., "Violaxanthin cycle kinetics analysed in vivo with resonance Raman spectroscopy",
Journal of Raman Spectroscopy, 2017



Koch et al., "Violaxanthin cycle kinetics analysed in vivo with resonance Raman spectroscopy",
Journal of Raman Spectroscopy, 2017



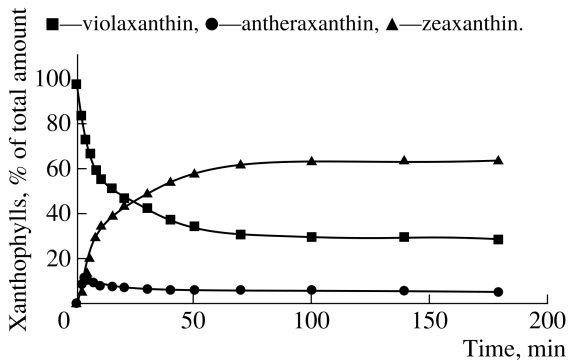
Koch et al., "Violaxanthin cycle kinetics analysed in vivo with resonance Raman spectroscopy",
Journal of Raman Spectroscopy, 2017



Quellen:

Jahns, "The Xanthophyll Cycle in Intermittent Light-Grown Pea Plants: Possible Functions of Chlorophyll a/b-Binding Proteins", 1995 (modifiziert)

https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Doperwt_rijserwt_peulen_Pisum_sativum.jpg
(18. August 2018)



Quellen:

Latowski et al., "Effect of the Temperature on Violaxanthin De-Epoxidation: Comparison of the In Vivo and Model Systems", 2003 (modifiziert)

<https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:LemnaTrisulca.jpg> (18. August 2018)

Zusammenfassung und Ausblick

Experimentelle Grundlagen zur Messung der Kinetik des Violaxanthinzyklus *in vivo* erfolgreich gelegt.

- ▶ *In vivo* Messung, keine destruktive Probenpräparation nötig
- ▶ Tausende anstelle einiger weniger mit Flüssigchromatographie bestimmten Messpunkte
- ▶ Zeitkonstante des Hell-Dunkel-Überganges je nach experimentellen Bedingungen zwischen 39 ± 8 und 46 ± 4 Minuten
- ▶ Zeitkonstante des Dunkel-Hell-Überganges: $3,2 \pm 1,0$ Minuten
- ▶ "Violaxanthin cycle kinetics analysed *in vivo* with resonance Raman spectroscopy", Journal of Raman Spectroscopy, 2017

Weitere Einflussfaktoren berücksichtigen:

- ▶ “Einschwingvorgänge”
- ▶ Hell-Dunkel-Rhythmen
- ▶ Intensität und Wellenlänge der Stressbeleuchtung
- ▶ Anzuchtbedingungen

Anwendungen:

- ▶ Selektionsfaktor für die Pflanzenzüchtung
- ▶ Erprobung der Stresstoleranz verschiedener Arten
- ▶ Schutz vor Licht- und Trockenstress im Zuge des Klimawandels

62 *Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!*

