

ANGEWANDTE CHEMIE

HERAUSGEGEBEN VON DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

68. Jahrgang · Nr. 8 · Seite 253–312 · 21. April 1956

FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT »DIE CHEMIE«

Der Photosynthese-Cyclus^{*)}

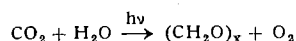
Von Prof. Dr. MELVIN CALVIN, University of California Radiation Laboratory, Berkeley, California

Nach einem Vortrag auf der GDCh-Hauptversammlung in München am 15. September 1955

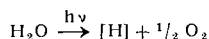
Als Substrat der Kohlendioxyd-Fixierung im Photosynthesecyclus wurde Ribulose-diphosphorsäure erkannt, die unter der Wirkung der „Carboxydismutase“ in zwei Molekeln Phosphoglycerinsäure übergeht. Aus Phosphoglycerinsäure wird durch Reduktion und eine Reihe von in allen Einzelheiten aufgeklärten Umwandlungsreaktionen neben den Endprodukten der Photosynthese Ribulose-diphosphorsäure zurückgebildet, so daß sich ein Cyclus ergibt. Da für diese Reaktionen außer vier Äquivalenten Wasserstoff auch drei Molekeln Adenosintriphosphorsäure notwendig sind, wird die Einbeziehung der Adenosintriphosphorsäure-Erzeugung durch Oxydationsprozesse in den photosynthetischen Kohlenstoffreduktionscyclus angenommen. Diese Vorstellung wird durch Messung des Quantenbedarfs unterstützt. Da α -Liponsäure (*thioctic acid*) unter geeigneten Bedingungen zum Anstieg der lichtabhängigen Sauerstoff-Entwicklung und der Quantenausbeute führt, scheint diese oder eine ähnliche Verbindung der Wasserstoff-Acceptor bei der photochemischen Primärreaktion zu sein. Das gebildete Dithiol könnte seinen Wasserstoff auf andere Redoxsysteme, letztlich auf Phosphoglycerinsäure übertragen. Es wird ein Chloroplasten-Modell vorgeschlagen, das diesen Vorstellungen Rechnung trägt.

Einführung

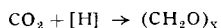
Bekanntlich besteht das Grundproblem der Photosynthese darin, wie die grünen Pflanzen elektromagnetische Energie in chemische Energie transformieren und speichern. Nach der Reaktion



werden Kohlendioxyd und Wasser in Kohlenhydrate und molekularen Sauerstoff umgewandelt. Sowohl theoretisch wie experimentell wurde diese Reaktion in zwei deutlich unterscheidbare Schritte getrennt. Es handelt sich erstens um den Quantenumwandlungsprozeß, in dem Wasser in ein reduzierendes Agens und ein halbes Mol Sauerstoff gespalten wird:



und zweitens um die darauf folgende Reduktion des CO_2 , bei der das reduzierende Agens $[\text{H}]$ zur Synthese der Kohlenhydrate verwendet wird.



Hier soll in der Hauptsache über den zweiten Teil des Prozesses berichtet werden. Durch Markieren mit ^{14}C konnten wir ein vollständiges Reaktionsschema aufstellen. Es handelt sich um ein Arbeitsprogramm, das sich über acht bis neun Jahre erstreckte und in einem Laboratorium mit wechselnder Mitarbeiterzahl und Größe ausgeführt wurde.

^{*)} Der größte Teil der hier beschriebenen Arbeit wurde niedergelegt in: 1.) „The Path of Carbon in Photosynthesis. XXI.“ von J. A. Bassham, A. A. Benson, L. D. Kay, A. Z. Harris, A. T. Wilson u. M. Calvin, J. Amer. chem. Soc. 76, 1769 [1954] und 2.) „Photosynthesis“ von J. A. Bassham u. M. Calvin, einem Artikel in „Currents in Biochemical Research“, herausgeg. von D. E. Green, im Druck bei Interscience Publishers, Inc. Das neuere Material dieser Arbeit stammt von J. R. Quayle, R. C. Fuller, J. Mayoudon, K. Shibata, J. A. Bassham u. D. F. Bradley und wird an den betreffenden Stellen besonders vermerkt.

Primärprodukte

Das Prinzip des Experimentes ist einfach: eine Pflanze wird in den stationären Zustand (*steady state*) der Photosynthese gebracht, mit markiertem Kohlendioxyd versetzt und der Weg des Kohlenstoffs durch die verschiedenen Umwandlungsstufen verfolgt. Hier soll nur kurz die Reihenfolge der Operationen, die zum Endergebnis führten, aufgezeichnet werden.

Nach Einstellung des stationären Zustandes der Grünalgen, die sich in einem sog. „lollipop“ (Bild 1) befinden,



Bild 1. „Lollipop“

wird zu einem bestimmten Zeitpunkt für Sekunden oder Minuten radioaktives Kohlendioxyd verabreicht. Durch Eintropfen in heißen Alkohol werden die Algen getötet. Der alkoholische Extrakt wird durch Papierchromatographie und Radioautographie auf die markierten Verbindungen untersucht. Bild 2 zeigt das Ergebnis eines 60-sec-Versuches: man kann ca. 20 Verbindungen, die aus radioaktivem Kohlenstoff gebildet wurden, erkennen. Da demnach 60 sec zu lang sind, verkürzten wir fortlaufend die

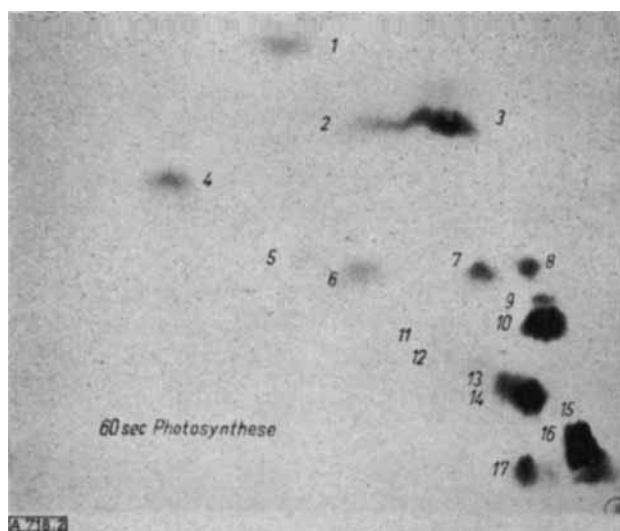


Bild 2. Chromatogramm eines Algenextraktes (60 sec Photosynthese mit radioaktivem Kohlenstoff)

- | | |
|------------------------------|------------------------------------|
| 1. Glykolsäure | 10. Phospho-glycerinsäure |
| 2. Glycerinsäure | 11. Triose-phosphat |
| 3. Äpfelsäure | 12. Pentose-phosphat |
| 4. Alanin | 13. Mannose- und Fructose-phosphat |
| 5. Glycin | 14. Seduheptulose-phosphat |
| 6. Serin | 15. Glucose-phosphat |
| 7. Asparaginsäure | 16. Ribulose-diphosphat |
| 8. Phospho-brenztraubensäure | 17. Uridin-diphosphoglucose |
| 9. Phospho-glykolsäure | |

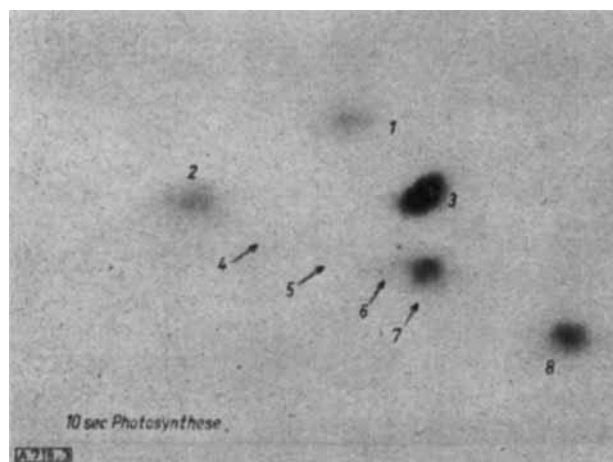


Bild 3. Chromatogramm eines Algenextraktes (10 sec Photosynthese mit Radiokohlenstoff)

- | | |
|--------------------------|--|
| 1. Phosphoenol-pyruvat | 5. Ribose-phosphat |
| 2. Dioxyaceton-phosphat | 6. Fructose- und Mannose-phosphat |
| 3. Phospho-glycerinsäure | 7. Glucose- und Seduheptulose-phosphat |
| 4. Ribulose-phosphat | 8. Ribulose- und Hexose-diphosphat |

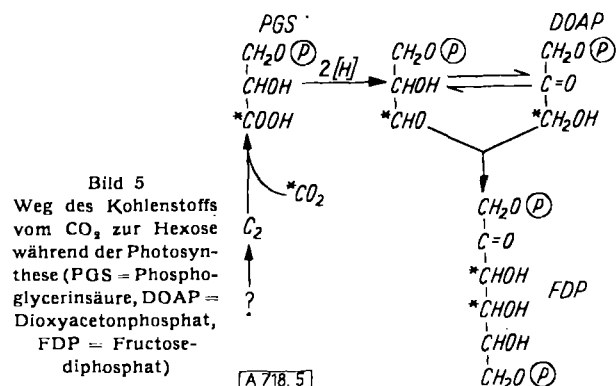
Versuchszeit. Bild 3 gibt ein 10-sec-Experiment wieder; hier ist eine Verbindung vorherrschend. Tatsächlich liegt der gesamte Radiokohlenstoff in der Phosphoglycerinsäure vor, wenn man das Experiment auf die Zeit Null extrapoliert. Wir hatten somit die erste Verbindung, in die das CO_2 bei der Photosynthese eingebaut wird, identifiziert.

COOH	49	
CHOH	25	
CH ₂ OH	26	
Hexose		
C ₃ , C ₄	52	
C ₂ , C ₅	25	
C ₁ , C ₆	24	

[A 718.4]

Bild 4
Verteilung des markierten Kohlenstoffs bei Photosyntheseexperimenten (15 sec Photosynthese; Gerstenblätter)

Bild 4 zeigt aus einem 15-sec-Experiment die Verteilung des Radiokohlenstoffs in den drei C-Atomen der Glycerinsäure, die aus Phosphoglycerinsäure gewonnen wurde. Die Hälfte der Radioaktivität erscheint in der Carboxyl-Gruppe, der Rest ist gleichmäßig auf die beiden anderen Kohlenstoff-Atome verteilt. Im gleichen Experiment wurde ein C_6 -Zucker isoliert, der ebenfalls abgebaut wurde. Der Radiokohlenstoff war in ihm praktisch ebenso verteilt wie in der C_3 -Kette der Glycerinsäure. Dies ließ sofort vermuten, daß in dem C_6 -Stück zwei C_3 -Stücke über die beiden Carboxyl-Gruppen der Phosphoglycerinsäure verbunden wurden, was natürlich nichts anderes ist, als die Umkehr der bekannten Aldolase-Spaltung von Fructosediphosphat bei der Glykolyse (s. Bild 5). Die Glycerinsäure



wird mit dem Wasserstoff der photochemischen Reaktion zu Glycerinaldehyd reduziert, welcher dann zu Ketotriose isomerisiert wird. Je zwei Molekeln davon ergeben eine Hexose. Es treten daher die beiden Kohlenstoff-Atome, die ursprünglich in der Carboxyl-Gruppe waren, in die Mitte der Hexose-Kette.

Sicher muß demnach ein CO_2 -Acceptor vorliegen, der in Glycerinsäure übergeht. Dieser Acceptor müßte weiterhin aus Phosphoglycerinsäure, Triosephosphaten und Hexosephosphaten oder irgendeiner aus ihnen entstehenden Substanz zurückgebildet werden.

Saccharose-Synthese

Kurz sei erwähnt, was wir über das Schicksal der Fructosediphosphorsäure und deren Einbau in den gewöhnlichen Rohrzucker (= Saccharose = Sukrose) wissen. Weitere Flecken auf dem Chromatogramm wurden identifiziert und daraus die Beziehungen zwischen Fructosephosphat und Saccharose aufgeklärt. Bild 6 zeigt den von uns gefundenen Zusammenhang. Hier sind Phosphoglycerinsäure,

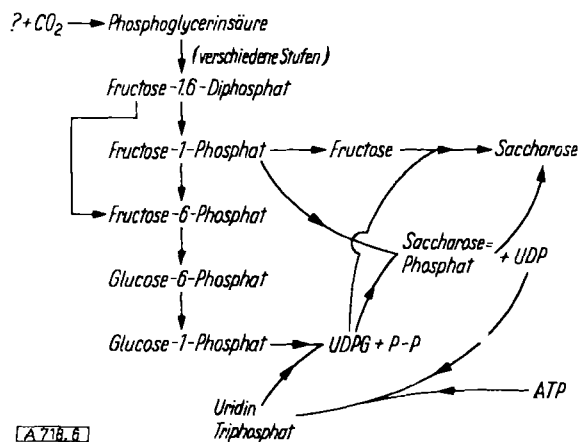
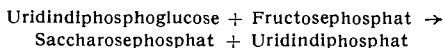


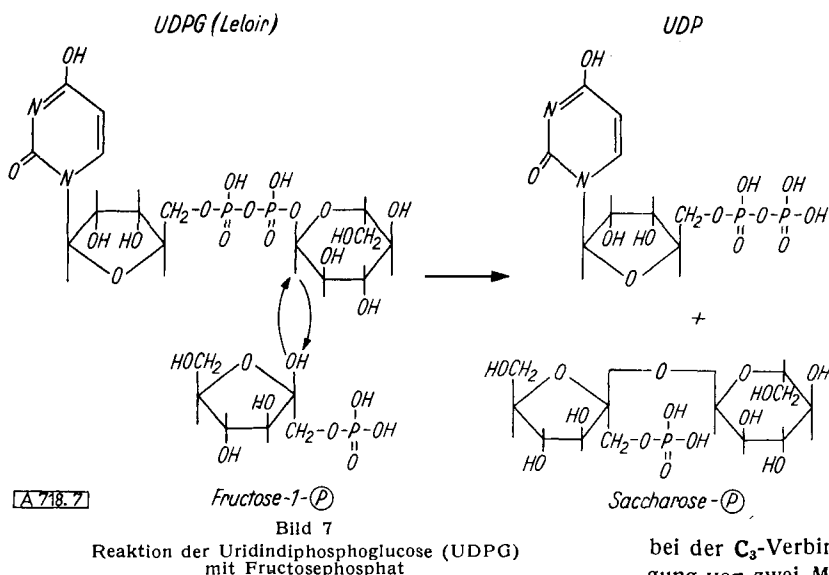
Bild 6

Vorgeschlagener Mechanismus für die Bildung von Saccharose mit Uridindiphosphoglucose (UDPG)

Fructosediphosphat und die verschiedenen Umwandlungsstufen, die letztlich zu Glucose-1-phosphat führen, abgebildet. Letzteres reagiert mit Uridintriphosphat, welches in Uridindiphosphoglucose übergeht; diese wurde papierchromatographisch nachgewiesen. Uridindiphosphoglucose, deren Glucose sehr schnell markiert wird, kann nun mit Fructose-1-phosphat weiter reagieren. Dabei entsteht Saccharosephosphat (das auf dem Papier gefunden wurde), welches zu Saccharose dephosphoryliert wird. Oder aber sie verbindet sich direkt mit freier Fructose zu Saccharose. Da jedoch nie freie markierte Fructose auftrat, scheint die erste dieser beiden Möglichkeiten der Hauptweg in den grünen Blättern zu sein. Ein Enzym, welches die Reaktion



katalysiert, wurde kürzlich in Argentinien von Leloir ange-reichert. Bild 7 zeigt die Strukturformel der Uridindiphosphoglucose und deren Reaktion mit Fructose-1-phosphat



zu Uridindiphosphat und Saccharosephosphat mit dem Phosphat an C₁ der Fructose-Hälfte. Der Phosphat-Rest wird schließlich unter Bildung von Saccharose abgelöst. Dies scheint der normale Weg zu sein, der zur Saccharose führt. Es ist zudem eine der wesentlichsten synthetischen Reaktionen der Pflanzenwelt, und sie liefert das Substrat für eine große Zahl weiterer Umwandlungen.

C₅- und C₇-Zucker

Kehren wir nun zu der Frage zurück, in welcher Weise der Kohlendioxyd-Acceptor von den bisher betrachteten Verbindungen gebildet oder regeneriert wird. Wir versuchten zunächst im Sinne des ursprünglichen Plans weiterzugehen, d. h. die zur Regeneration des Acceptors führenden Stufen durch Nichtberücksichtigung der Phosphoglycerinsäure zu erfassen; auf die Zeit Null extrapoliert hätte dann die am stärksten (zu 100%) markierte Verbindung die nächste in der Reihenfolge sein müssen. Dieser Weg erwies sich aber als unmöglich, da nämlich drei oder vier Verbindungen herausextrapoliert werden. Somit werden nach Phosphoglycerinsäure und Triose nicht eine, sondern mehrere Komponenten gleichzeitig als Vorstufe der Triose gebildet. Diejenigen Substanzen, die neben den C₆-Zuckern gefunden wurden, waren ein C₅-Zucker und ein C₇-Zucker, so daß also Zucker mit drei, fünf, sechs und sieben Kohlenstoffatomen nachgewiesen wurden.

Eine genaue Analyse über die Verteilung der Radioaktivität in den C-Atomen dieser Zucker ergab den in Bild 8

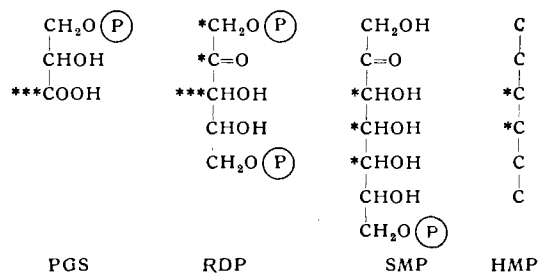


Bild 8

Verteilung des Radiokohlenstoffs in verschiedenen Zuckern. (PGS = Phosphoglycerinsäure; RDP = Ribulosediphosphat; SMP = Sedoheptulosemonophosphat; HMP = Hexosemonophosphat)

dargestellten Befund. Neben der Phosphoglycerinsäure handelt es sich um einen C₅-Zucker, Ribulosediphosphat, einen C₇-Zucker, Sedoheptulosephosphat und um das Skelett eines C₆-Zuckers, welches entweder der Glucose oder der Fructose zugeordnet werden kann (letzte sind im wesentlichen die gefundenen C₆-Zucker). Die Sterne geben die Größenordnung der Radioaktivität in diesen Verbindungen wieder. Auf Grund solcher Analysen konnten wir die Beziehung der verschiedenen Verbindungen zueinander aufdecken.

In gleicher Weise, wie wir den Zusammenhang zwischen der Phosphoglycerinsäure und der Hexose erkannt hatten, konnten wir jetzt die Beziehung zwischen den betrachteten 5-, 7-, 6- und 3-Kohlenstoffverbindungen ableiten. Zwischen den C₅- und C₇-Zuckern besteht offensichtlich keine so einfache strukturelle Verwandtschaft wie sie bei der C₃-Verbindung und dem C₆-Zucker durch Vereinigung von zwei Molekeln Phosphoglycerinsäure zum Ausdruck kommt. Weder im C₅ noch im C₇ liegt nämlich eine Anordnung vor, die als intakte C₃- oder C₆-Kette angesprochen werden kann. Erst als wir erkannten, daß der C₅-Zucker aus mehr als einer Vorstufe hervorgehen könne, gelang es uns, einen Weg aufzuzeigen, der möglicherweise seiner Bildung entspricht. Dieser Ablauf ist in Bild 9 dargestellt. Nimmt man zwei Kohlenstoffatome vom oberen Teil der C₇-Kette weg und addiert sie an ein C₃-Stück,

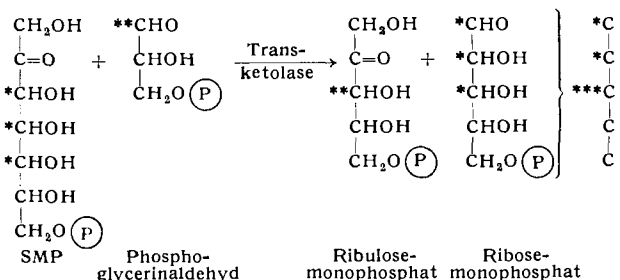
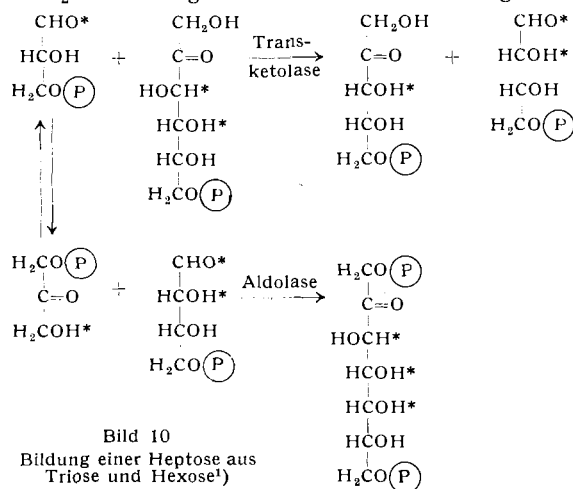


Bild 9. Bildung der C₅-Zucker aus Sedoheptulosephosphat¹⁾

¹⁾ Nachdem auf die stereospezifische Natur der Transketolase hingewiesen (P. Stumpf, private Mitteilg.) und diese Spezifität beschrieben wurde (P. A. Srere, J. Cooper, V. Klybas u. E. Racker, Arch. Biochem. Biophys. 59, 535 [1955]), haben wir bei Nachforschung in der Pentosemonophosphat-Gegend des Chromatogramms Xylose gefunden (unveröffentl. Ergebnisse aus unserem Laboratorium von S. A. Barker, U. C. Quarck u. J. A. Bassham). Also sollte in diesem und in folgenden Bildern höchstwahrscheinlich die Primärphospho-ketopentose als Xylose-5-phosphat bezeichnet werden, welches dann durch eine Epimerase in Ribulose-5-phosphat überführt wird (B. L. Horecker, J. Hurwitz u. P. S. Smyrniotis, J. Amer. chem. Soc. 78, 692 [1956]).

welches wie Phosphoglycerinaldehyd markiert ist, so erhalten wir zwei C₅-Verbindungen, eine Ribulose und eine Ribose. Der Durchschnitt beider entspricht der tatsächlich gefundenen Markierung. Dies gab uns einen Hinweis für die Herkunft der gefundenen Ribose und des Ribulosephosphates. Durch die Transketolase-Reaktion des Sedoheptulosephosphates mit dem Triosephosphat erhält man die beiden Pentosephosphate. Diese können durch geeignete Isomerisierung ineinander umgewandelt werden. Wir haben somit aus Heptose und Triose die beiden Pentosen gebildet.

Die Bildung der Hexose aus zwei Triosen ist uns bekannt. Die Frage, die offen bleibt, lautet: Woher kommt die Heptose? In einer sehr langwierigen Arbeit wurde wiederum eine eingehende Analyse über die Verteilung des Kohlenstoffs in Abhängigkeit von der Zeit ausgeführt. Sie führte letztlich zu dem Ergebnis, daß die Heptose durch Vereinigung eines C₄- und eines C₃-Stückes entstanden sein mußte. Die sich daraus ergebende Frage lautete: Woher kommt das eigentümlich markierte C₄-Stück? Dieses konnte nur aus der Spaltung einer Hexose in eine C₄- und eine C₂-Verbindung resultieren. Bild 10 zeigt dieses



Schema. Die beiden abgebildeten Triosen können bekanntlich eine Hexose bilden; die Triose ergibt mit der Hexose einmal eine Pentose und — unter dem Einfluß der Transketolase — eine Tetrose. Die Tetrose kann mit der anderen Triose mittels der Aldolase zur Heptose reagieren, womit die passende Verteilung des Kohlenstoffs erreicht wird. Soviel zum Zusammenhang der einzelnen Zucker: der Triose, der Tetrose, der Pentose, der Hexose und der Heptose. Alle stehen untereinander in Beziehung und werden sämtlich aus der Phosphoglycerinsäure gebildet; keine wurde jedoch als Vorstufe erkannt, die als CO₂-Acceptor funktioniert.

Identifizierung des CO₂-Acceptors

Die Identifizierung wurde durch eine völlig andere Versuchsanordnung erreicht. Ihr lag nicht die soeben geschilderte Geschwindigkeit des ¹⁴C-Einbaues, sondern die Konzentrationsbestimmung der einzelnen Verbindungen zugrunde. Es wurde der momentane Gehalt jeder Verbindung bestimmt und die Veränderung der Konzentrationen unter verschiedenen Bedingungen erfaßt. So wurden beispielsweise die Konzentrationen der Pentose, der Triose und der Phosphoglycerinsäure (d. h. der aus der Triose stammenden Säure) sowie eine Reihe anderer Verbindungen im „steady state“ bestimmt. Wir schalteten dann das Licht ab, um zu sehen, was mit den einzelnen Verbindungen geschehen würde. Das Ergebnis ist in Bild 11 dargestellt. Daraus geht hervor, daß nach 5 min genug Koh-

lenstoff in die Pflanze eingedrungen ist, um die verschiedenen Verbindungen, wie Phosphoglycerinsäure, Ribulosediphosphat und Hexosemonophosphat zu sättigen, die demnach in einer Art Kreisprozeß untereinander in Beziehung stehen. Ihre spezifische Aktivität entspricht jetzt

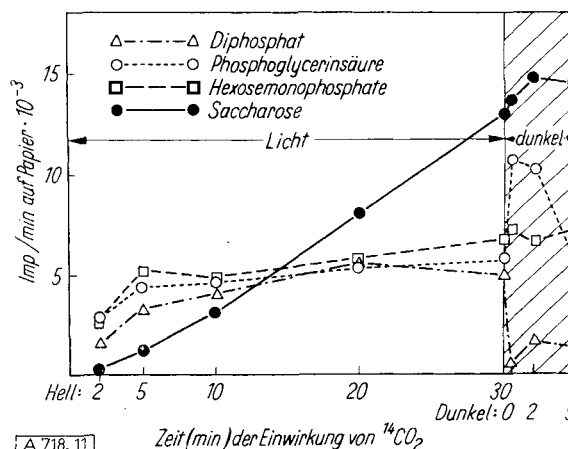
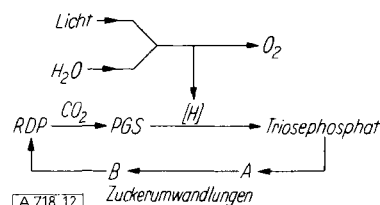


Bild 11. Einfluß von Licht und Dunkel auf die Konzentrationen von Zuckerphosphaten und Saccharose

der des in die Pflanze eintretenden ¹⁴CO₂. Die Saccharose ist als Speicherprodukt natürlich nicht gesättigt; ihre Aktivität nimmt ständig zu. Sofort nach dem Abschalten des Lichtes tritt ein sehr interessantes Phänomen auf. Ribulosediphosphat (Pentosephosphat) zeigt ein starkes Absinken, während die Phosphoglycerinsäure enorm ansteigt. Dies gab uns den Fingerzeig, daß Ribulosediphosphat die unmittelbare Vorstufe der Phosphoglycerinsäure sei. Bild 12 zeigt das von uns angenommene cyclische System in einem Schema mit den Beziehungen zwischen Ribulosediphosphat, Phosphoglycerinsäure, Triosephosphat

Bild 12
Vorgeschlagenes cyclisches Schema für die Zusammenhänge bei der Photosynthese (PGS = Phosphoglycerinsäure; RDP = Ribulosediphosphat)



und den anderen Zuckern. Ribulosediphosphat ergibt hier über die Carboxylierung mit CO₂ Phosphoglycerinsäure; die Einzelheiten dieser Reaktion sollen später beschrieben werden. Phosphoglycerinsäure wird durch das bei der Photolyse des Wassers gebildete reduzierende Agens (Wasserstoff) zu Triosephosphat, das auf dem Zuckerniveau liegt, reduziert. Über eine Reihe von Umwandlungen, wie sie früher beschrieben wurden, führt der Weg vom Triosephosphat über die Hexose, Pentose und Heptose zurück zur Ribulose. Dies spielt sich alles auf dem Oxydationsniveau der Zucker ab und erfordert sehr wenig Energie. Wir können auf diese Weise Ribulose aus Triose regenerieren. Es wird jetzt verständlich, daß wir nach dem Abschalten des Lichtes, wodurch die Bildung des reduzierenden Agens unterbunden wird, in Gegenwart von CO₂ Phosphoglycerinsäure aufbauen können, während Ribulosediphosphat absinkt. Dies ist genau das, was wir beobachteten und worauf sich der Entwurf dieses Teiles des Schemas gründet.

Darüber hinaus läßt sich aber noch vor Ausführung eines Versuches ein weiterer Schluß aus diesem Schema ziehen; was geschieht nämlich bei plötzlicher Veränderung des CO₂-Druckes? Es kann leicht vorausgesagt werden, daß unter Konstanthaltung des Lichtes bei plötzlicher Verminderung des CO₂-Druckes — d. h. bei Blockierung der

Carboxylierungsreaktion — eine Synthese von Ribulosediphosphat und ein Verlust an Phosphoglycerinsäure eintreten müßte. Dieses ist auch wirklich der Sachverhalt, wie man aus dem in Bild 13 wiedergegebenen Versuchsergebnis sieht. Hier ist nochmals das cyclische Schema des Bildes 12 mit der Reihenfolge seiner Reaktionen abgebildet.

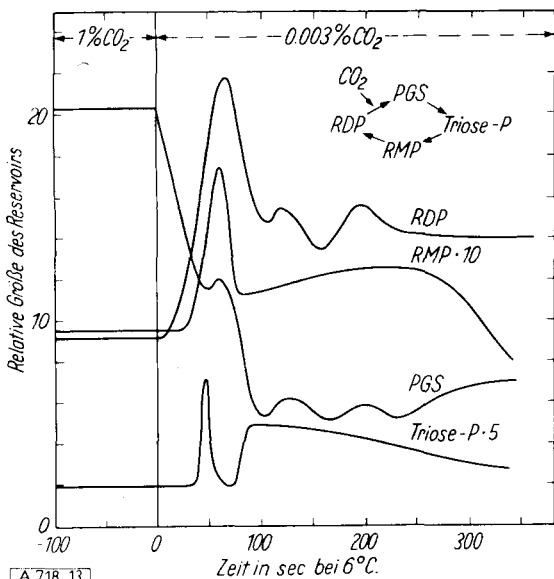


Bild 13

Übergänge im regenerierenden Cyclus (PGS = Phosphoglycerinsäure; RDP = Ribulosediphosphat; RMP = Ribulosemonophosphat)

Der Cyclus

In Bild 14 ist das gesamte Schema in allen Einzelheiten mit Strukturformeln und beteiligten Fermenten zusammengestellt. Das CO_2 tritt durch die Carboxylierungsreaktion am Ribulosediphosphat unter Bildung von Phosphoglycerinsäure in den Cyclus ein. Dies war eine aus dem Mechanismus und der Kinetik des vorstehend beschriebenen Systems postulierte Reaktion. Das beteiligte Enzym war, im Gegensatz zu den Enzymen der übrigen Reaktionen des Cyclus, bisher noch nicht nachgewiesen oder isoliert worden. Die anderen Enzyme sind:

Triosephosphat-dehydrogenase ergibt Triosephosphat; die Triose unterliegt dann einer Reihe von Umformungen — durch Isomerase zur Ketose, welche mit Aldolase Fructosediphosphat ergibt; mit Phosphatase zu Fructosemonophosphat; dann mit Transketolase zu Tetrosephosphat, welches wieder mit Aldolase das Heptosediphosphat ergibt; mit Phosphatase zu Heptosemonophosphat; wieder mit Transketolase zu den beiden Pentosephosphaten; Ribosephosphat mit Isomerase ergibt Ribulosemonophosphat; es folgt eine Phosphorylierung mit Adenosintriphosphat und Phosphopentosekinase, um endlich zum Ribulosediphosphat zu gelangen.

Jedes dieser Enzyme, beginnend von Phosphoglycerinsäure durch alle Umwandlungen, wurde isoliert und beschrieben. Sämtliche Reaktionen wurden auch unabhängig in vitro ausgeführt, ausgenommen die erste (man kann sie auch als die letzte bezeichnen), welche das CO_2 fixiert.

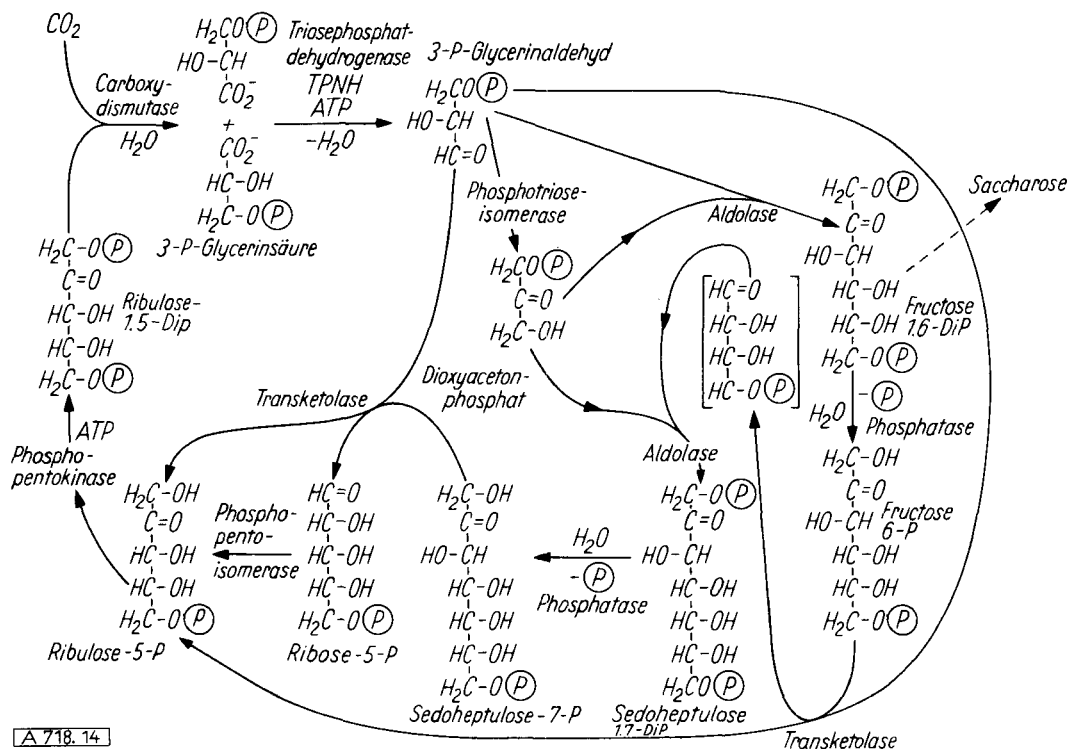


Bild 14. Der vollständige Weg des Kohlenstoffs im Photosynthese-Cyclus³⁾

Zu dem Zeitpunkt, da CO_2 von 1% auf 0,003% absinkt, steigen zunächst Ribulosediphosphat, dann Ribulosemonophosphat und zuletzt Triosephosphat an. Die erste Verbindung, die im Rahmen dieses gerichteten Ablaufes („forward pulse“) absinkt, ist das Triosephosphat; es folgen dann Ribulosemonophosphat und endlich Ribulosediphosphat. Auf diese Weise erhalten wir eine gute Bestätigung für den Ablauf eines solchen cyclischen, rückgekoppelten („feedback“)-Systems.

Carboxydismutase

Angeregt durch unsere Isotopenversuche fanden wir vor etwa einem Jahr eine aus Algen und anderen grünen Pflanzen gewonnene zellfreie Fraktion, die die Bildung von Phosphoglycerinsäure aus Ribulosediphosphat und NaHCO_3 spezifisch katalysiert. Die für diese Untersuchungen verwendete Ribulosediphosphorsäure wurde durch Chromatographie aus Pflanzenextrakten gewonnen: Die Technik war folgende: Ribulosediphosphat und dem Enzym-

präparat wurde $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ zugesetzt und die Bildung der Carboxyl-markierten Phosphoglycerinsäure nachgewiesen (Bild 15). Auftretende Spuren von Äpfelsäure, Citronensäure und Asparaginsäure sowie Alanin geben den Hinweis,

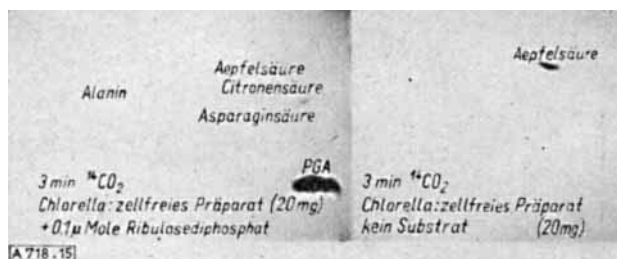
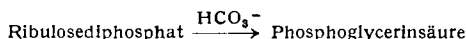


Bild 15

Chromatogramme, welche die Bildung Carboxyl-markierter Phosphoglycerinsäure anzeigen (PGA-PGS-Phosphoglycerinsäure)

daß in dem Präparat noch Enzyme des *Krebs-Cyclus* vorhanden sind, die Phosphoglycerinsäure in andere Verbindungen überführen. Läßt man beispielsweise dieses Rohpräparat über eine längere Zeit (> 3 min) einwirken, so wird der größte Teil der Phosphoglycerinsäure umgesetzt. Da in Abwesenheit des Substrates Ribulosediphosphat ebenfalls etwas Äpfelsäure gebildet wird, scheinen Brenztraubensäure und das „malic enzyme“ vorhanden zu sein.

Da in diesen Untersuchungen CO_2 und nicht Ribulosediphosphat markiert war, gab es keinen direkten Anhaltspunkt für das Schicksal der fünf C-Atome der Ribulose. Es war daher notwendig, den Versuch mit markiertem Ribulosediphosphat und inaktivem CO_2 auszuführen, was jedoch bei der Verwendung des unreinen Enzympräparates zunächst nicht befriedigend gelang. So werden nämlich, bedingt durch die im Enzympräparat vorliegenden Fermente, neben der markierten Phosphoglycerinsäure eine große Zahl anderer markierter Verbindungen aus Ribulosediphosphat gebildet; eine Phosphatase bewirkte beispielsweise die Bildung von Ribulose-5-phosphat, das dann in Gegenwart der Transketolase und der Aldolase (wahrscheinlich auch der Transaldolase) schnell in Hexose, Heptose und Triose, die durch Oxydation in Phosphoglycerinsäure übergehen kann, umgewandelt wird. Versuche, diese Schwierigkeiten durch Hemmung der auf Ribulosediphosphat eingestellten Phosphatase zu umgehen, waren wegen der Empfindlichkeit des Systems



gegen Fluorid-Ionen wenig befriedigend. Es war daher notwendig, das Präparat von allen Enzymen zu befreien, die auf Ribulosediphosphat einwirken, ausgenommen natürlich desjenigen (bzw. derjenigen), welches die Phosphoglycerinsäure-Bildung (aus CO_2) bewirkt. Dies gelang erstmalig aus einem neutralen Extrakt des Neuseeland-Spinates (*Tetragonia expansa*) und später mit Extrakten aus Algen, die durch Ultraschall aufgeschlossen worden waren. Das Enzym tritt in der Protein-Fraktion auf, die aus einem neutralen Extrakt bei einer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung zwischen ungefähr 0,3 und 0,4 ausgesalzen wurde. Das Ergebnis eines der ersten Experimente mit einem derartigen auf Ribulosediphosphat wirkenden Präparat ist in Bild 16 dargestellt²⁾. In Gegenwart von Enzym und NaHCO_3 ist der gesamte Kohlenstoff der Ribulose offensichtlich in Phosphoglycerinsäure übergegangen. In sämtlichen Versuchen traten zwar außerdem noch Zuckermomonophosphate auf, was zum Teil daher rühren mag, daß sie im Original-

Ribulosediphosphat vorhanden waren; wahrscheinlich war zudem im Enzympräparat auch noch ein Rest Phosphatase. Wir konnten später aber Präparate darstellen, die den gesamten Kohlenstoff der Ribulosediphosphorsäure nur in Phosphoglycerinsäure und in keine andere Verbindung überführen.

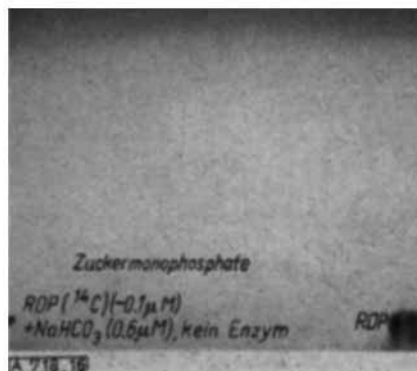
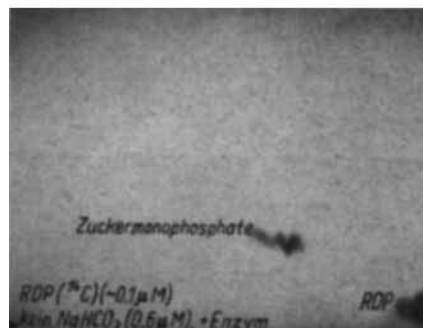
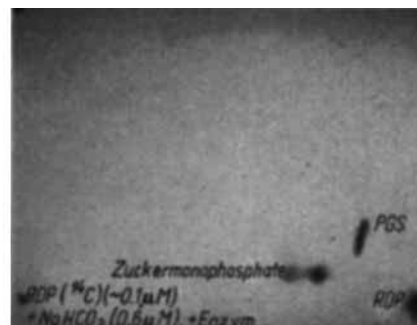
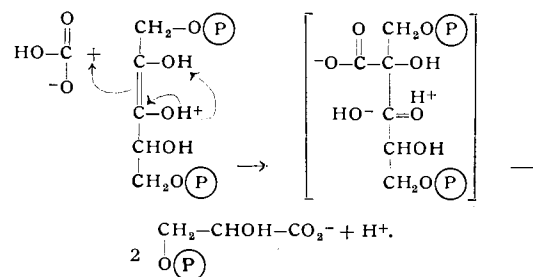


Bild 16

Chromatogramme, welche Enzymwirkungen auf Ribulosediphosphat zeigen

Somit dürfte die ursprünglich angenommene Formulierung der Reaktion wahrscheinlich zutreffen:



Es verbleibt noch die Möglichkeit, daß neben der oben angenommenen hydrolytischen Spaltung eine reduktive Spaltung der carboxylierten Pentose (enzymgebunden) im Licht zwischen C_2 und C_3 stattfinden kann; sie würde zu einer Molekel Phosphoglycerinsäure und zu einer Molekel Phosphoglycerinaldehyd führen. Unsere derzeitigen Ergebnisse sprechen aber nicht für diese Möglichkeit.

²⁾ Unveröffentl. Ergebnisse aus unserem Laboratorium von J. Mayoudon (I.R.S.I.A. Fellow, Brüssel, Belgien, 1954).

Da die Carboxylierungsreaktion auf Kosten der Oxydation des C_3 der Ribulose zur Carboxyl-Stufe stattfindet, wird der Name „Carboxydismutase“ für dieses Ferment vorgeschlagen. Von Interesse ist fernerhin, daß das Ferment bisher nicht in tierischen Geweben (Rattenleber) nachgewiesen wurde und daß es aus den hochorganisierten intakten Chloroplasten³⁾ des Spinates leicht abgetrennt werden kann, mit denen es assoziiert ist. Gegen „Versen“ (Äthylendiamintetraacetat), o-Phenanthrolin und Cyanid scheint es nicht besonders empfindlich zu sein; dagegen tritt durch p-Chlor-quecksilber(II)-benzoat eine Hemmung ein, die durch Cystein aufgehoben werden kann.

Chemische Voraussetzungen für den Ablauf des Cyclus

Um zum Schema zurückzukehren, so haben wir jetzt den Cyclus in allen Einzelheiten erfaßt und kennen genau die für den Kreislauf notwendigen Verbindungen. Werfen wir jetzt einen Blick auf die für das Inganghalten des Cyclus erforderlichen Verbindungen, um zu sehen, was wir über den Energiebedarf aussagen können. Für die Reduktion der Phosphoglycerinsäure zur Triose sind eine Molekel Triphosphopyridinnucleotid (TPNH) und eine Molekel Adenosintriphosphat notwendig. Bis zum Ribulose-5-phosphat ist im Rahmen der rückläufigen Zuckerumlagerungen keine Energie mehr erforderlich; hier benötigen wir zur Bildung von Ribulosediphosphat wiederum eine Molekel Adenosintriphosphat. Überschlägt man schließlich den Energiebedarf für den Einbau des CO_2 zu Triosephosphat, d. h., die Reduktion einer Molekel CO_2 zur Kohlenhydratstufe, so findet man vier Äquivalente des reduzierenden Agens; insgesamt werden also 4 Elektronen und 3 Molekeln Adenosintriphosphat benötigt. Damit haben wir soweit es das CO_2 betrifft, den gesamten Energiebedarf festgelegt. Jeder Molekel CO_2 , die in Kohlenhydrat umgewandelt werden soll, müssen wir also 4 Elektronen (4 Reduktionsäquivalente) und drei Molekeln Adenosintriphosphat anbieten. Dies alles wird allein durch Licht, d. h. durch irgendeine Umwandlung von elektromagnetischer Energie, bewirkt. Man kann nun sagen, daß an die Reduktion des Kohlenstoffs außer der Bildung dieser beiden Substanzen keine weiteren Bedingungen an eine photochemische Reaktion geknüpft sind. Gelingt es uns, diese beiden Substanzen aus anderen Quellen als der photochemischen Reaktion zu beziehen, so könnten wir den gesamten Vorgang ablaufen lassen. Wir dürfen annehmen, daß dies auch geschieht, vorausgesetzt, die notwendigen Enzyme sind vorhanden⁴⁾. In der Natur liegt nun tatsächlich eine derartige Situation vor. Wir müssen lediglich zur gleichen Zeit und am gleichen Ort hohe Konzentrationen des Reduktionsmittels, das nach unserer jetzigen Kenntnis TPNH sein kann, sowie Adenosintriphosphat zur Verfügung stellen.

Ablauf des Cyclus ohne Licht

Neben dem Geschehen in der grünen Pflanze gibt es in der Natur nun ein System, in dem eine derartige Situation verwirklicht ist. Jedenfalls ist uns nur dies eine bekannt; es handelt sich um eines der photosynthetisierenden Purpurbakterien, die CO_2 mit molekularem Wasserstoff redu-

zieren, jedoch keinen Sauerstoff entwickeln. Die Bilder 17 und 18⁵⁾ zeigen, daß die CO_2 -Reduktion entweder durch Licht oder aber durch ein chemisches Oxydationssystem bewirkt werden kann. Der zur Diskussion stehende Organismus ist das Purpurbakterium *Rhodospseudomonas*

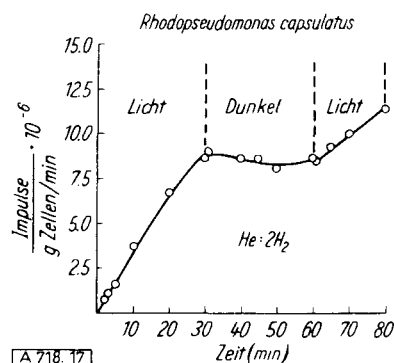


Bild 17
Photoreduktion von CO_2 durch Purpurbakterien

capsulatus. Der anfängliche Anstieg entspricht der lichtbedingten CO_2 -Reduktion, die Wasserstoff als reduzierendes Agens und außerdem Licht erfordert. Nach Abschalten des Lichtes wird die CO_2 -Reduktion unterbunden. Bild 18 zeigt den gleichen Organismus bei Dunkelreduktion, bei der er nur Helium und Wasserstoff erhält. Die anfängliche Fixierung kommt wegen der schnell eintretenden Sättigung zum Stillstand. In gleicher Weise wie das Licht setzt zugeführter O_2 die Fixierung wieder in Gang.

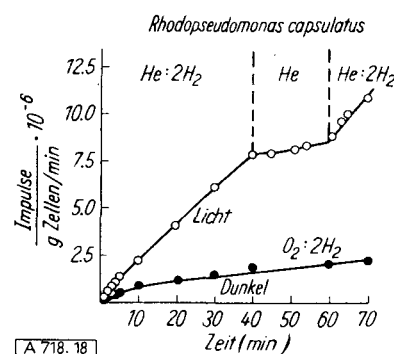


Bild 18
Chemische Reduktion von CO_2 durch Purpurbakterien

Die Intermediärprodukte sind im Dunkeln weitgehend dieselben. Der Wasserstoff liefert hierbei wahrscheinlich die nötige Reduktionsenergie; Sauerstoff oxydiert einen Teil des Wasserstoffs und bildet Adenosintriphosphorsäure. Beide zusammen halten dann den CO_2 -Cyclus in Gang. Wenn Wasserstoff mit seinem großen Potential Reduktionsmittel ist, scheint die primäre Funktion des Lichtes in der Ergänzung des notwendigen Oxydationsmittels für die Bildung des Adenosintriphosphates zu bestehen.

Der Quantenbedarf

Um den kleinsten Quantenbedarf der Photosynthese auf Grund der bisher gewonnenen Kenntnisse über den detaillierten Mechanismus des Prozesses bestimmen zu können, müssen wir, hinsichtlich der Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung und Materie, zumindest eine Voraussetzung machen. Diese besteht darin, daß ein Quant nicht mehr als ein Elektron anregen kann. Eine

³⁾ R. Clinton Fuller, unveröffentl. Beobachtungen aus unserem Laboratorium.

⁴⁾ E. Racker, Nature [London] 175, 249 [1955].

⁵⁾ Inzwischen konnte E. Racker⁴⁾ eine solche CO_2 -Fixierung in vitro durch Verwendung der spezifischen Enzyme demonstrieren. Unter dem Einfluß eines Gemisches von löslichen Enzymen kann CO_2 bis zu Zucker reduziert werden, wenn TPNH als Reduktionsmittel und Adenosintriphosphat als Energiequelle verwendet werden.

⁵⁾ A. O. M. Stoppani, R. C. Fuller u. M. Calvin, J. Bacteriol. 69, 491 [1955].

weitere notwendige Annahme für das Verhalten des angeregten Elektrons ist die, daß es durch einen chemischen (oder physikalischen) Dismutationsprozeß nicht mehr als ein Reduktionsäquivalent auf der Stufe des TPNH erzeugt. Wenn dies der Fall ist, so könnte man, zurückblickend auf die bereits erwähnten Bedingungen, das Quantenminimum solch eines Vorganges voraussagen, ohne dabei die Energieausbeute der Sauerstoff-Entwicklung am Schluß der Reaktionsfolge in Rechnung zu stellen: wir benötigen vier Elektronen für die Reduktion und drei Molekeln Adenosintriphosphat.

Über die verschiedenen Wege, auf denen Adenosintriphosphat erzeugt werden kann, wissen wir heute hinreichend Bescheid. Wir wissen z. B., daß durch die Übertragung von zwei Elektronen vom DPNH auf ein Atom Sauerstoff, d. h. einem halben Mol O_2 , schätzungsweise zwei oder drei Molekeln Adenosintriphosphat gebildet werden. Man kann daher annehmen, daß, wenn die Gesamtenergie für den Ablauf des Cyclus nur vom Licht getragen wird, der miniale Quantenbedarf 6 beträgt — nämlich vier Elektronen für die Reduktion und zwei weitere für drei Molekeln Adenosintriphosphat. Es müßte aber, unter der Voraussetzung, daß für die Erzeugung der drei Adenosintriphosphat-Molekeln andere Quellen als das Licht zur Verfügung stehen, möglich sein, Bedingungen zu finden, unter denen der Quantenbedarf für die CO_2 -Reduktion und die Sauerstoff-Entwicklung nur 4 beträgt. In einer Arbeit konnten wir diese Bedingungen tatsächlich realisieren⁶⁾. Die Quantenausbeute ergab sich rein zufällig. Es stand uns eine Apparatur zur Verfügung, in der eine direkte Messung der O_2 -Entwicklung, und zwar nicht mittels des Gasdruckes sondern auf Grund der paramagnetischen Eigenschaften des Sauerstoffes, unzweideutig möglich war. Fernerhin konnten wir die Menge des absorbierten Kohlendioxyds durch Bestimmung seines Infrarotspektrums in der Gasphase direkt erfassen; auch hier war also keine Druckmessung erforderlich. Durch solche direkte Messung der Gasentwicklung und -absorption konnten wir den Quantenbedarf für die O_2 -Entwicklung unter verschiedenen Bedingungen ermitteln. Die Bestimmung der Lichtabsorption gelang ohne große Komplikationen durch Streuung (Verwendung eines sehr flachen Systems!).

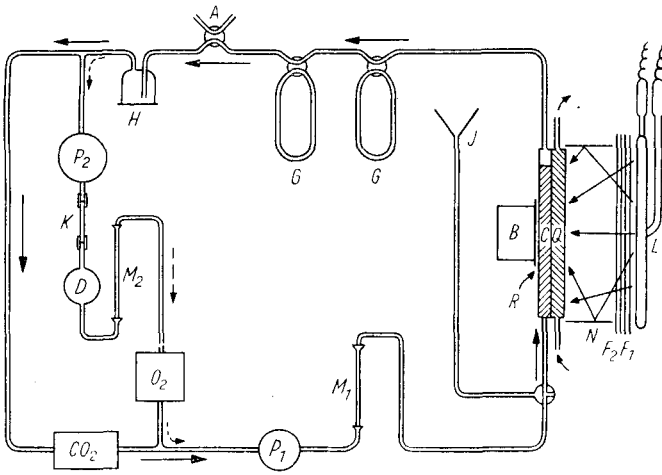


Bild 19

Schematisches Diagramm des Apparates für die Messung des Quantenbedarfs der Photosynthese. (C = Algengefäß; B = Bolometer; Q = Wasserbehälter; N = reflektierende Röhre; O₂ = Sauerstoff-Analysator; CO₂ = Kohlendioxyd-Analysator; A = Hahn; K = Kapillare; P₂ = Pumpe; D = Kugel; G = Glasrohr, welches N₂ enthält; H = Gummimembran; J = Rohr zur Einführung der Algen; F = Filter; M = Strömungsmesser; R = opakes Glas; L = Lichtquelle)

⁶⁾ J. A. Bassham, K. Shibata u. M. Calvin, Biochem. Biophys. Acta 17, 332 [1955].

In Bild 19 ist ein Schema der verwendeten Apparatur dargestellt. Bild 20 zeigt die Art der Aufzeichnung, bei der die Anzeige beider Analysatoren einem „multi-point-recorder“ zugeführt wird. Die Kurven entsprechen den Partialdrucken des CO_2 und des O_2 .

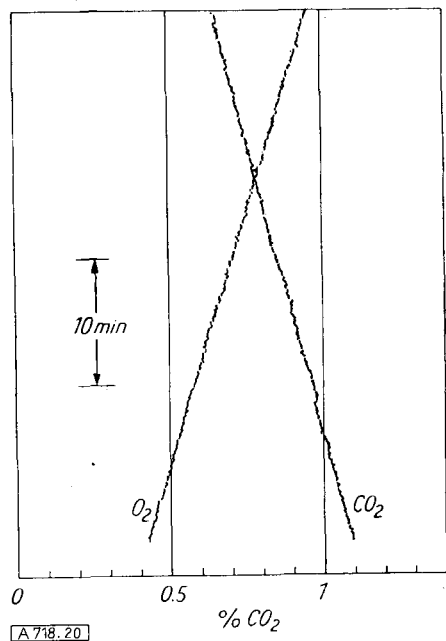


Bild 20

Direkt registrierter Gasaustausch bei der Quantenausbeutebestimmung. Die ganze Skala entspricht 1,3% Änderung in % O_2

Aus dem Volumen des Systems können wir exakt auf das pro Minute absorbierte oder entwickelte Gas schließen. Aus dem absorbierten Licht können wir weiterhin den Quantenbedarf berechnen. Das Ergebnis ist in Bild 21 dargestellt. Die ausgefüllten Punkte zeigen den scheinbaren Quantenbedarf für die O_2 -Entwicklung ohne Korrektur an. Ohne irgendwelche Voraussetzungen zu machen, ist hier lediglich die Zahl der entwickelten Molekeln O_2 durch die Zahl der in derselben Zeit absorbierten Lichtquanten dividiert worden. Wie man sehen kann, sinkt bei großer Lichtintensität (q ist die Zahl der pro Sekunde absorbierten Quanten) der Quantenbedarf auf etwas weniger als 8 (ca. 7–7,5). Die P/R-Skala gibt das Geschwindigkeitsverhältnis Photosynthese: Respiration (Atmung) in der unmittelbar der Photosynthese-folgenden Dunkelperiode wieder. Im Bereiche großer Lichtintensität war die Geschwindigkeit der Photosynthese 10–12 mal größer als die der Rückreaktion, d. h. der Sauerstoff-Absorption in der darauffolgenden Dunkelperiode. Wir machen nun die durchaus berechtigte Annahme, daß die O_2 -Entwicklung in der gerade vorausgegangenen Lichtperiode nahezu den gleichen Wert besitzt wie in dem Moment, da das Licht

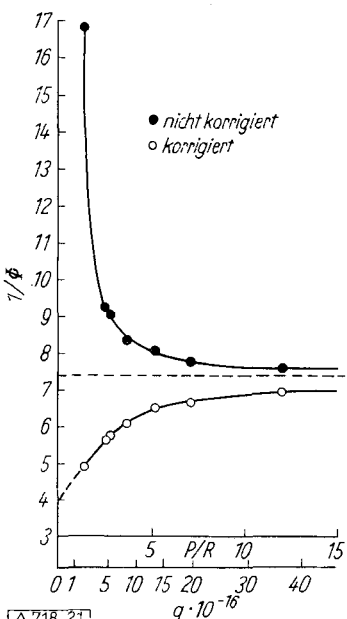


Bild 21. Quantenbedarf der Photosynthese bei Chlorella

abgeschaltet wird; addieren wir jetzt den Betrag der Reabsorption zur O_2 -Entwicklung hinzu, so entspricht der Quantenbedarf den Werten der offenen Punkte. Wird, relativ zur Photosynthese, die Atmung größer und größer, so sinkt der Quantenbedarf kontinuierlich ab. Wie man sieht, wird auf relativ kleine Photosynthese extrapoliert, der Wert 4 erreicht*). Unter diesen Bedingungen wird das Licht — oder die aus den Quanten entwickelten Elektronen — nicht zur Adenosintriphosphat-Bildung benutzt; die Elektronen können ausschließlich für den Reduktionsprozeß verwendet werden, so daß der Quantenbedarf diesen niedrigen Wert von 4 einnimmt. Wird jedoch die Geschwindigkeit der Reduktion so groß, daß entweder die Geschwindigkeit der Adenosintriphosphat-Bildung außerhalb der Chloroplasten nicht schnell genug geht, um diese aufrecht zu erhalten, oder die Diffusion ist nicht groß genug und Adenosintriphosphat muß am Orte der Reduktion erzeugt werden, dann müssen wir einige aus dem photochemischen Prozeß resultierende Elektronen zur Adenosintriphosphat-Bildung verwenden und die Quantenausbeute wird absinken, d. h. die Zahl der benötigten Quanten nähert sich einem Wert von 7.

Dies scheint eine sehr brauchbare und gute Bestätigung der bisher betrachteten Vorstellung zu sein. Wie die Elektronen durch das Licht gebildet werden und wie im Bedarfsfalle Elektronen in Adenosintriphosphat umgewandelt werden, wissen wir noch nicht, wir haben jedoch einige anregende Hinweise.

Umwandlung der Quanten

Es wurde bisher nur die Reduktion des CO_2 betrachtet. Da dieses System aber von der Sauerstoff-entwickelnden Reaktion völlig getrennt zu sein scheint, könnte man annehmen, daß man aus der CO_2 -Reduktion keine Aussagen über die lichtabhängige Bildung der Elektronen und des Adenosintriphosphates machen kann. Zwischen diesen beiden Prozessen muß aber offensichtlich eine enge Verbindung bestehen; durch geeignete Beobachtungen war es uns möglich, einen Punkt zu erkennen, an dem der Kohlenstoff-Reduktions-Cyclus mit dem photochemischen Prozeß direkt in Verbindung steht. Dies wird in Bild 22 gezeigt, wo unter anderem wiederum der Cyclus abgebildet ist. Das Quant wird zunächst vom Chlorophyll absorbiert und

daraufhin in etwas umgewandelt, woraus das reduzierende Agens $[H]$ und das oxydierende Agens $[O]$ resultieren. Das reduzierende Agens kann Glycerinsäure zu Triose reduzieren. Ein Teil des reduzierenden Agens wird wahrscheinlich mit Sauerstoff selbst oder aber mit Zwischenprodukten auf dem Wege zum Sauerstoff zur Bildung des Adenosintriphosphates herangezogen, da dieser Prozeß für den Ablauf des Cyclus unerlässlich ist. Bis zu diesem Punkt sind es die schon behandelten Vorgänge; die nun folgenden Beobachtungen betreffen das Verbindungsglied zwischen dem photochemischen Apparat und dem Kohlenstoff-Cyclus — nämlich das $[H]$. Wir wollen sehen, welche Auskünfte wir aus dem Studium dieses Verbindungsglieds für den Mechanismus der Quantenumwandlung erhalten können.

Hemmung des Eintritts von Verbindungen in den Tricarbonsäurecyclus durch das Licht

In dem folgenden Experiment wurde die Veränderung des stationären Zustandes bei plötzlichem Wechsel der Bedingungen untersucht. Dem in Bild 23 abgebildeten Ergebnis liegt die gleiche Versuchsanordnung wie der zu Beginn beschriebenen Untersuchung zugrunde, nur wurde das Augenmerk auf andere Verbindungen gerichtet.

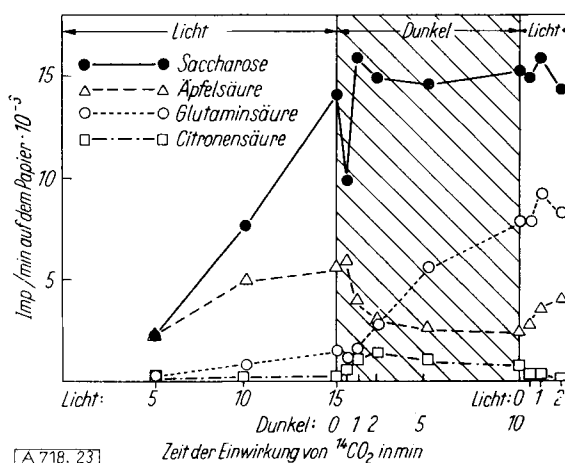


Bild 23
Wirkung von Licht und Dunkel auf die Bildung von Saccharose, Äpfelsäure, Glutaminsäure und Citronensäure

Schenken wir hier vornehmlich der Glutaminsäure und der Citronensäure Beachtung, so finden wir, daß im Licht die Bildungsgeschwindigkeit dieser beiden markier-

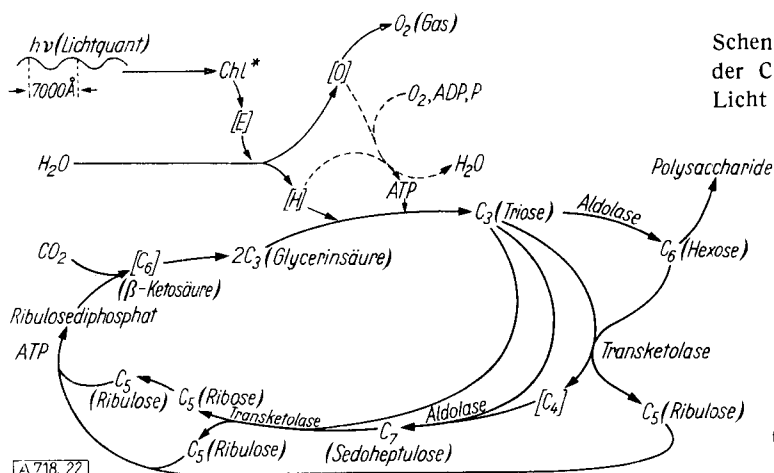


Bild 22
Vorgeschlagener Cyclus für die Kohlenstoff-Reduktion bei der Photosynthese

) Dieser Quantenbedarf von 4 bei kleiner Photosynthese-Geschwindigkeit ist in keiner Weise mit den Werten von 3 bis 4 nach Warburg und Mitarbeitern bei sehr hohem P/R-Verhältnis (> 20) zu vergleichen).

*) O. Warburg, G. Krippahl, W. Buchholz u. W. Schröder, Z. Naturforsch. 8b, 675 [1953].

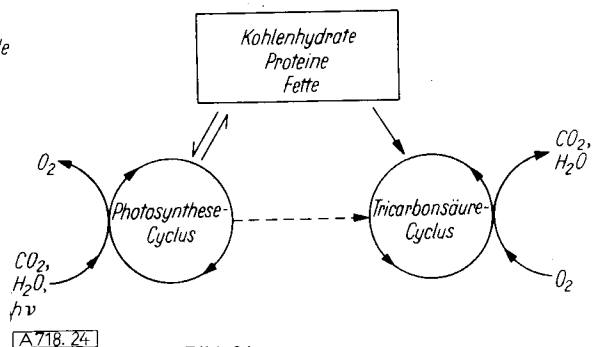
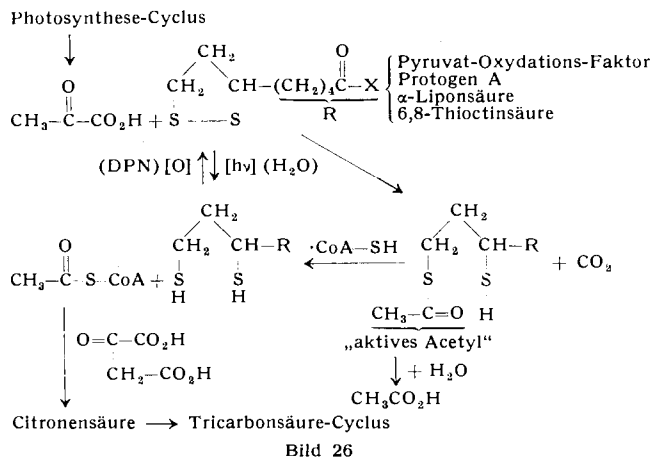
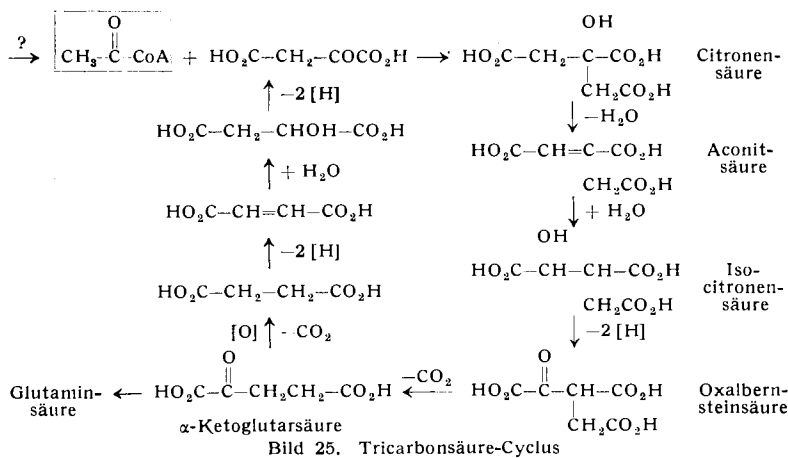


Bild 24
Schematische Beziehungen zwischen dem Photosynthese-Cyclus, dem Tricarbonsäure-Cyclus und den Speicherprodukten in der Pflanze

ten Produkte recht klein ist. Mit dem Abschalten des Lichtes steigt aber die Bildungsgeschwindigkeit dieser Verbindungen unverzüglich um das mehrfache an. Glutaminsäure und Citronensäure sind nun Substanzen, die mit dem



Mechanismus der photochemischen Kontrolle der Beziehungen zwischen Photosynthese-Cyclus und Tricarbonsäure-Cyclus

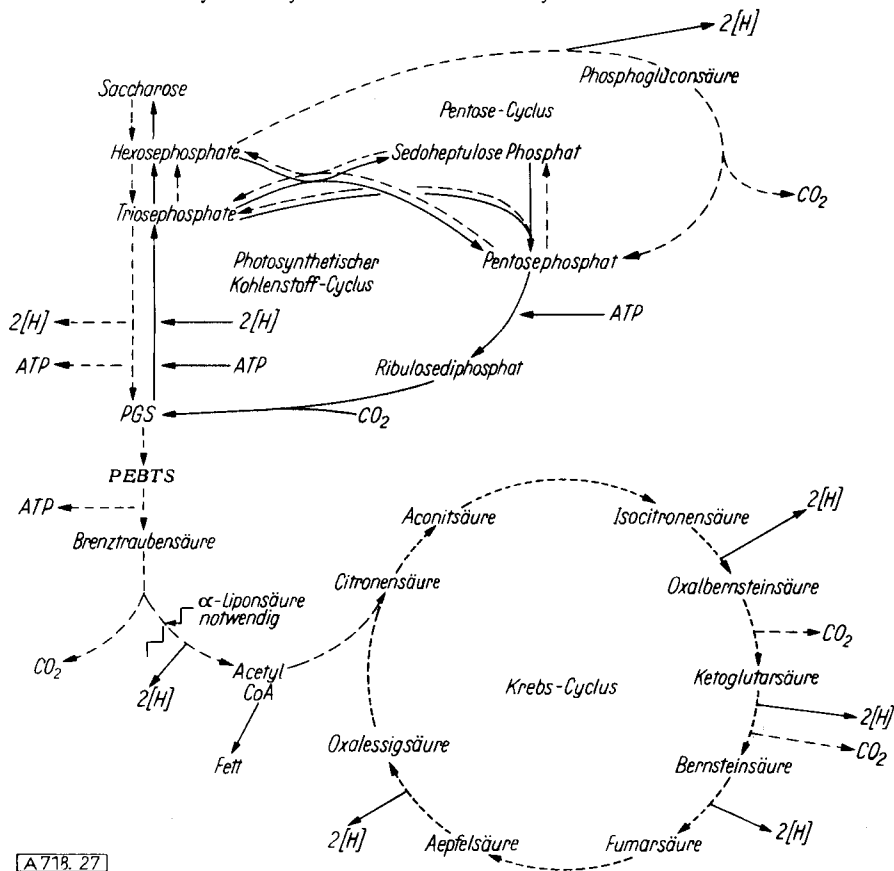


Bild 27

Einige Beziehungen zwischen dem Photosynthese-Cyclus und dem Atmungs-cyclus. (---- oxydative Stufen; — reduzierende (photosynthetische) Stufen; PEBTS = Phosphoenolbrenztraubensäure)

Krebs-Cyclus eng verknüpft sind. Schematisch beschreibt Bild 24 die gefundenen Tatsachen. Hier ist einmal der bereits besprochene Photosynthese-Cyclus und zum anderen der Tricarbonsäure- (oder Krebs-) Cyclus, dessen Einzelheiten in Bild 25 gezeigt sind, abgebildet. Während Citronensäure und Glutaminsäure im Tricarbonsäure-Cyclus liegen oder mit ihm in Verbindung stehen, enthält der Photosynthese-Cyclus keine dieser beiden Substanzen; wie wir aber gesehen haben, bildet er Phosphoglycerinsäure und Zucker. Diese direkten Produkte des Photosynthese-Cyclus werden wahrscheinlich in Kohlenhydrate, Eiweiße und Fette überführt und gelangen im Endeffekt

in den Tricarbonsäure-Cyclus. Dies ist der Hauptweg im Licht. Nimmt man das Licht aber nun fort, so wird unmittelbar eine direkte Verbindung zwischen den beiden Kreisläufen hergestellt und Phosphoglycerinsäure kann direkt in die Komponenten des Tricarbonsäure-Cyclus übergehen. Die Bilder 25, 26 und 27 zeigen diesen Mechanismus in allen Einzelheiten. Bild 25 zeigt den Tricarbonsäure-Cyclus und wie der Kohlenstoff über die Kondensation von Oxalessigsäure und Coenzym A zu Citronensäure in den Cyclus gelangt. Wir sind somit bei einer der besprochenen Komponenten angelangt. Im weiteren Verlauf wird diese dann in Glutaminsäure überführt. Die Frage ist nun, wie Glycerinsäure zu Acetyl-Coenzym A umgewandelt wird. Dies muß ja sehr schnell im Dunkeln und langsam im Licht geschehen. Glücklicherweise haben wir einige Anhaltspunkte für die Bildung von Acetyl-Coenzym A

aus Glycerinsäure, was in Bild 26 dargestellt ist. Die Phosphoglycerinsäure wird dephosphoryliert und in Brenztraubensäure überführt; letztere reagiert dann mit einem Enzymsystem, dessen prosthetische Gruppe die α -Liponsäure ist, woraus Acetyl- α -liponsäure und Kohlendioxid resultieren. Die Acetyl- α -liponsäure unterliegt dann einer „Umesterung“ am Schwefel mit Coenzym A. Es werden reduzierte α -Liponsäure und Acetyl-Coenzym A gebildet, welches dann nach dem in Bild 27 aufgezeichneten Weg in den Citronensäure-Cyclus eintritt⁸⁾.

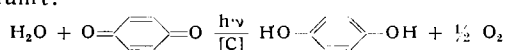
Wie wird nun dies durch das Licht bewirkt? Die in Bild 26 gezeigte Reaktion ist die Tür für den Eintritt des Kohlenstoffs in den Tricarbonsäure-Cyclus. Wird diese Tür durch Entfernen oder durch Reduktion des Disulfids geschlossen, so kann damit das Auftreten von markiertem Kohlenstoff aus dem Photosynthese-Cyclus im Citronensäure-Cyclus verringert werden. Demzufolge nehmen wir

⁸⁾ J. A. Bassham u. M. Calvin: „Photosynthesis“, ein Kapitel in „Currents in Biochemical Research“, Interscience Publishers, Inc. (im Druck).

an, daß das Licht das Gleichgewicht von der Disulfid- zur Dithiol-Form verschiebt, indem es eine Reaktion mit anderen Substanzen als Brenztraubensäure, wahrscheinlich mit Wasser induziert. Im Dunkeln wird das Dithiol durch Oxydation zum Disulfid zurück überführt und die Pyruvat-Oxydase kann wieder arbeiten. Dieses System ist mit einem Ventil zu vergleichen, welches durch Licht geschlossen wird und welches eine Kontrolle über den direkten Eintritt des Kohlenstoffs vom Photosynthesecyclus in den Tricarbonsäure-Cyclus ausübt. Weiterhin drängt sich die Annahme auf, daß das Disulfid mit dem Elektronen-Acceptor der photochemischen Reaktion eng verwandt, wenn nicht gar mit ihm identisch sei. Tatsächlich geben eine Reihe von Versuchen Hinweise dafür, daß diese Annahme zu Recht bestehen könnte.

α -Liponsäure-Effekte

Bereits vor längerer Zeit konnte durch Belichtung von Grana, Chloroplasten oder ganzen Algen in Gegenwart eines geeigneten Elektronen-Acceptors (oxydierendes Agens), der nicht CO_2 ist, aus Wasser Sauerstoff entwickelt werden (Hill-Reaktion). Als Beispiel sei das Chinon angeführt:



Bei dieser Reaktion bedeutet [C] eine Chlorophyll enthaltende Struktur mit einem Minimum an Größe und Organisation. Wenn nach der obigen Annahme α -Liponsäure oder eine aus ihr abgeleitete Verbindung mit dem photochemischen Teil in enger Verbindung steht, sollte durch deren Zuführung zu einem geeigneten System ein Anstieg der Quantenausbeute für die Sauerstoff-Produktion erwartet werden. Dies wurde in der Tat beobachtet⁹⁾. Das durch Zuführung von α -Liponsäure resultierende Ansteigen der Quantenausbeute bei der Sauerstoff-Produktion wird aber nur unter Bedingungen erreicht, in denen der Elektronen-Acceptor die geschwindigkeitsbegrenzende Größe ist.

Bild 28⁹⁾ zeigt das Ansteigen der Quantenausbeute bei Zugabe von α -Liponsäure zu einem Sauerstoff-produzierenden System, in dem Chinon der Elektronen-Acceptor ist. Dieses System arbeitet nur unter Bedingungen, bei denen der Elektronen-Acceptor den geschwindigkeitsbegrenzenden Faktor darstellt; somit kann die α -Liponsäure zwar der Elektronen-Acceptor sein, braucht aber nicht als Acceptor für den aus dem Wasser stammenden

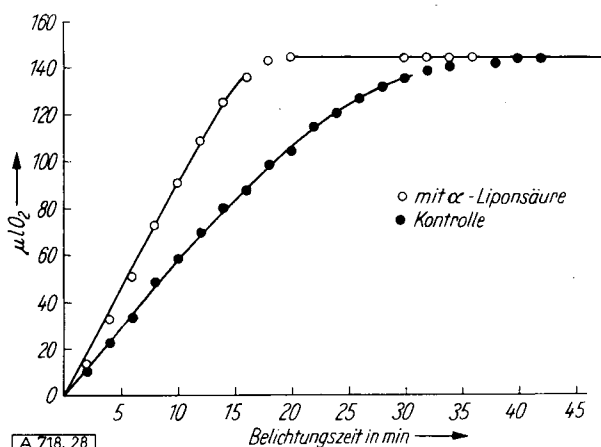


Bild 28

Effekt der α -Liponsäure auf die Geschwindigkeit der Sauerstoff-Entwicklung durch belichtete Algen in Gegenwart von Chinon

⁹⁾ D. F. Bradley u. M. Calvin, Arch. Biochem. Biophys. 53, 99 [1954].

Sauerstoff zu fungieren. Pro Mol zugesetzter α -Liponsäure kann tatsächlich die Geschwindigkeit relativ zum Chinon um das 10fache ansteigen, woraus hervorgeht, daß Liponsäure für diesen Prozeß einen wesentlich höheren Wirkungsgrad aufweist, obwohl thermodynamisch gesehen die Reduktion erschwert ist.

Obleich somit gezeigt ist, daß die α -Liponsäure zwischen der Lichtaktivierung und der Reduktion des Chinons eingeschaltet sein kann, und tatsächlich ist, wird aber damit nicht die Frage beantwortet, ob ein vermittelndes Glied zwischen der Lichtaktivierung und der Reduktion der α -Liponsäure existiert. Bei Versuchen mit Lichtblitzen¹⁰⁾ (etwa 200 Mikrosekunden Blitzdauer) über die beschleunigende Wirkung der α -Liponsäure wurden die Dunkelperioden zwischen den Blitzen genügend lang gehalten, so daß keine der nicht unmittelbar mit dem photoaktivierten Zustand in Zusammenhang stehenden Reaktionen geschwindigkeitsbegrenzend war. Diese Experimente gaben aber keine klare Antwort, zum Teil weil die Lichtintensität pro Blitz nicht genügend groß war um eine Sättigung zu erreichen. Sie gaben jedoch ein Anzeichen dafür, daß auf Grund der vorliegenden α -Liponsäure-Konzentrationen¹¹⁾ die Lebensdauer des angeregten Elektronenzustandes in der natürlichen Chlorophyll-enthaltenden Struktur [C] länger als bei sämtlichen bisher untersuchten molekularen Lösungen von Chlorophyll sein müßte. Es muß hier besonders darauf hingewiesen werden, daß diese Annahme nur notwendig ist, wenn die α -Liponsäure direkt in den Mechanismus der Sauerstoff-Entwicklung wie auch in den der Reduktion eingreift¹²⁾. Die ursprüngliche Vorstellung¹³⁾ über ihre Funktion bezog sich jedoch nur auf die Reduktion zum Dithiol, d. h. auf ihre Rolle als Elektronen-Acceptor. Eine Trennung der Funktionen findet aber neben anderen Beobachtungen eine weitere Stütze in der offensichtlichen Unempfindlichkeit der Hill-Reaktion mit Chinon gegen Quecksilber-Vergiftung¹⁴⁾. Wir geben daher den Gedanken auf, daß α -Liponsäure Acceptor sowohl für den Wasserstoff als auch für den Sauerstoff bei der Wasserspaltung ist und vertreten die Ansicht, daß sie nur den Wasserstoff, d. h. die Elektronen aufnimmt. Wenn wir weiterhin annehmen, daß irgendeine andere Verbindung als Sauerstoff-Acceptor fungiert, oder die Elektronen vom Sauerstoff wegnimmt, dann ist die Situation gerettet, und wir erhalten unter diesen Voraussetzungen die α -Liponsäure als alleinigen Acceptor von angeregten Elektronen. Unter diesen Voraussetzungen muß dann etwas anderes als Elektronen-Donator in Betracht gezogen werden; mit anderen Worten heißt dies, man muß nach dem Acceptor des positiven „Lochs“ suchen, welches nach dem Entfernen des angeregten Elektrons zurückbleibt.

Wir gelangen so zu einer Vorstellung, die nicht nur Vorbilder in der Physik und Physikochemie hat und den größten Teil, wenn nicht alle Schwierigkeiten beseitigt, denen wir bisher begegnet sind (das gleiche ist auch für hier nicht genannte Ergebnisse zutreffend⁸⁾), sondern die darüber hinaus eine Funktion für die durch neuere Untersuchungen bekannt gewordene Mikrostruktur¹⁵⁾ (Lamellenausbildung auf makromolekularer Basis) der Untereinheiten (Grana)¹⁵⁾ der Chloroplasten vermittelt. Sie beruht auf der Annahme,

¹⁰⁾ D. F. Bradley u. M. Calvin, Proc. nat. Acad. Sci. USA 14, 563 [1955].

¹¹⁾ Die Bestimmung gelang durch Messung der biologischen Aktivität für das Wachstum von Propionat-geheimtem *S. faecalis*. R. C. Fuller, unveröffentl. Messungen aus unserem Laboratorium.

¹²⁾ Siehe J. A. Bartrop, P. M. Hayes u. M. Calvin, J. Amer. chem. Soc. 76, 4348 [1954].

¹³⁾ J. A. Bartrop u. M. Calvin, J. Amer. chem. Soc. 74, 6154 [1952].

¹⁴⁾ J. S. C. Wessels u. E. Havinga, Recueil Trav. chim. Pays-Bas 71, 809 [1952]; 73, 1076 [1953].

¹⁵⁾ A. Frey-Wyssling, Endeavour 14, 34 [1955].

daß das Chlorophyll photochemisch nicht als einzelne Molekel reagiert, sondern als organisiertes, orientiertes Aggregat in Funktion tritt¹⁶⁾. Bei der Lichtabsorption geht in diesem Aggregat ein Elektron vom molekularen Niveau in ein Leitfähigkeitsband über. Bild 29^{a)} ent-

hält eine schematische Darstellung dieser Annahme, in der gleichzeitig die Beziehungen zum Photosynthese-Cyclus, zum Krebs-Cyclus, zur Sauerstoff-Entwicklung und dem Phosphorylierungsmechanismus (Adenosintriphosphat-produzierendes System) aufgezeichnet sind. Die durch Lichteinwirkung erzeugten Elektronen und „Löcher“ werden sofort durch ein vorhandenes elektrisches Feld (etwa derart, wie es an einer n-p-Verbindung in einem Halbleiter vorliegt) auf die entgegengesetzten Seiten der laminaren Struktur getrennt. Die an den „Elektroden“ stattfindenden Reaktionen sind an den Seiten des dreischichtigen Diagramms dargestellt (Bild 29b).

Eines der Hauptprobleme, worauf diese Annahme eine Antwort gibt, ist die Lebensdauer des angeregten Zustandes. Wegen des Wirkungsgrades und der Kinetik des photochemischen Prozesses sprechen bekanntlich viele Argumente entweder für eine lange Lebensdauer des angeregten Zustandes, oder dafür, daß der Umwandlungsfaktor — d. h. der Energieacceptor — in einer Konzentration in der Größenordnung des Chlorophylls vorliegen muß. Abgesehen vom Wasser oder verwandten Verbindungen (wie möglicherweise Carotinoid-Alkoholen) kennt man keinen Stoff,

der in dieser Menge vorliegt. Wir stellen darum das Wasser an die eine und das Disulfid an die andere Seite der Photobatterie (Bild 29). Die in der Chlorophyll-Schicht erzeugten Leitungselektronen wandern nun auf

die eine Seite der Doppelschicht, worauf die „Löcher“ auf der anderen durch Elektronenzufuhr aus dem Wasser besetzt werden. Letzteres ist in großer Menge vorhanden, so daß auf diese Weise die Rückreaktion unterbunden wird. Es entstehen somit langlebige Elektronen, die an der gegenüberliegenden Seite der Schicht auf die Schwefel-Verbindung warten; letztere durchläuft mehrmals ihren Cyclus und nimmt dabei alle Elektronen auf.

Dies ist der neueste Stand unserer Vorstellungen, der in Übereinstimmung mit dem größten Teil unserer heutigen Kenntnisse steht.

(Übersetzt von H. Holzer und G. Jacobi)

Eingegangen am 5. August 1955 [A 718]

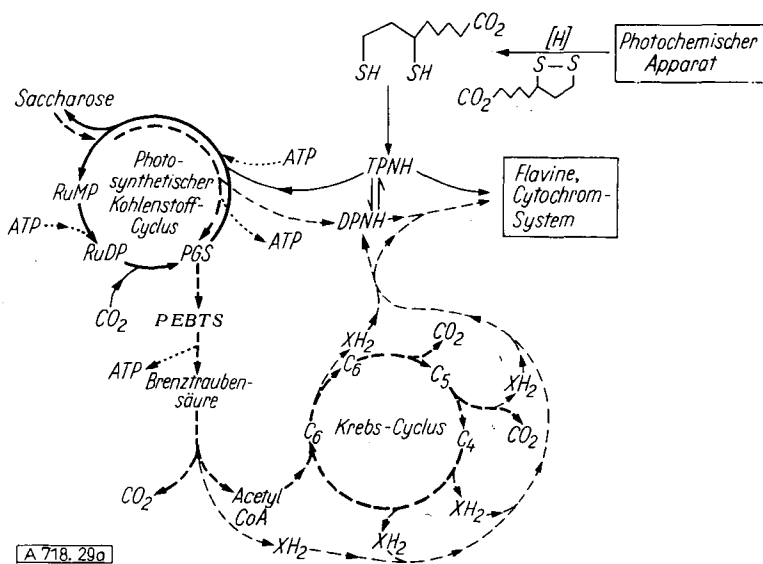


Bild 29a

Vorschlag für den Aufbau des photochemischen Apparates und seine Beziehung zu anderen Funktionen. (---- oxydative oder Atmungswege; — reductive oder photosynthetische Wege; ATP = Adenosintriphosphorsäure; RuMP = Ribulosemonophosphat; RuDP = Ribulosediphosphat; PEBTS-Phosphoenolbrenztraubensäure)

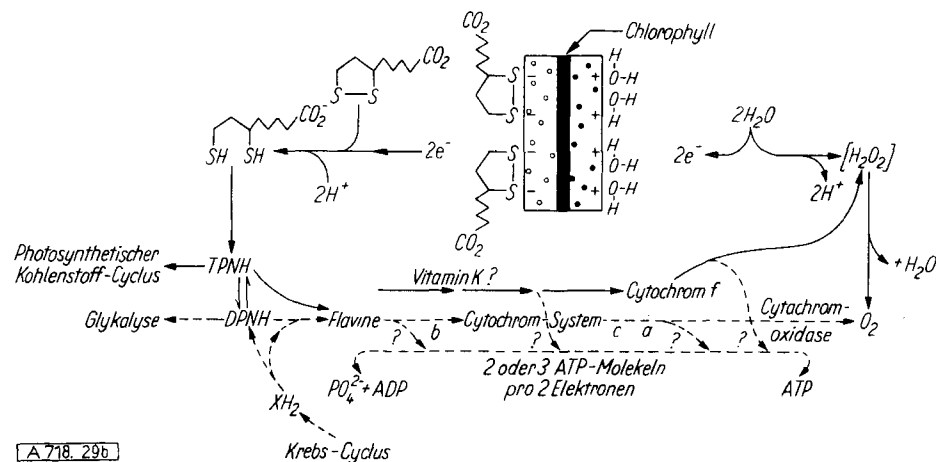


Bild 29b

Vorschlag für den Aufbau des photochemischen Apparates und seine Beziehungen zu anderen Funktionen. (---- oxydative oder Atmungswege; — = reductive oder photosynthetische Wege)

¹⁶⁾ In dieser Hinsicht ähnlich der „Photosynthese-Einheit“ nach R. B. Emerson u. W. Arnold, J. Gen. Physiol. 16, 191 [1932] und Wohl, New Phytologist 40, 31 [1941].