

Der Weg des Kohlenstoffs in der Photosynthese

Nobel-Vortrag am 11. Dezember 1961 [*]

VON PROF. DR. MELVIN CALVIN

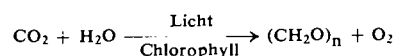
DEPARTMENT OF CHEMISTRY AND LAWRENCE RADIATION LABORATORY,
UNIVERSITY OF CALIFORNIA, BERKELEY, CALIFORNIA, USA

Einleitung

Vor fast 60 Jahren berichtete *Emil Fischer* an dieser Stelle über seine Arbeiten, die zur Strukturaufklärung der Glucose und verwandter Verbindungen geführt hatten [1]. Wir können heute Versuche beschreiben, aus denen hervorgeht, wie photosynthetisierende Organismen diese Kohlenhydrate aus CO_2 und Wasser unter Mitwirkung der Energie des Lichtes synthetisieren.

Spekulationen über den Verlauf der Umwandlung von CO_2 in Kohlenhydrate begannen bald, nachdem man die Existenz einer derartigen Umwandlung erkannt hatte. Erste Untersuchungen stammen von *Justus von Liebig*, *Adolf von Baeyer*, *Richard Willstätter* und *Arthur Stoll* führten sie weiter. Zunächst gelang es jedoch vor allem *Otto Meyerhof* [2] und *Hans Krebs* [3] – den Weg der entgegengesetzten Reaktion zu klären, d.h. den Abbau von Kohlenhydrat im tierischen Organismus zu Kohlendioxyd und Wasser und die Ausnutzung der dabei freigesetzten Energie.

Für die Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie kann man summarisch die Gleichung



schreiben. Ich begann mich für die Vorgänge, die dieser Gleichung zugrundeliegen, zu interessieren, als ich nach meiner Promotion von 1935 bis 1937 bei Professor

[*] Das lebenswürdige Entgegenkommen des Autors und des Nobelkomitees, Stockholm, ermöglicht es uns, diesen Nobel-Vortrag, der erst später in den Veröffentlichungen des Nobelkomitees erscheinen wird, schon jetzt zu bringen.

[1] *E. Fischer*: Les Prix Nobel. Stockholm 1902.

[2] *O. Meyerhof*: Les Prix Nobel. Stockholm 1923.

[3] *H. A. Krebs*: Les Prix Nobel. Stockholm 1953.

Michael Polanyi in Manchester arbeitete. Dort lernte ich die besonderen Eigenschaften von Koordinationsverbindungen mit metallischem Zentralatom kennen, vor allem der Metallporphyrine wie Häm und Chlorophyll. Damals begann ich mit einer Untersuchung über das elektronische Verhalten solcher Metallporphyrine, die noch heute läuft und die bei meiner Rückkehr nach Berkeley durch Anregungen von Professor *Gilbert N. Lewis* ausgedehnt und verallgemeinert wurde. Ich hoffe, daß diese Arbeiten eines Tages zum Verständnis des Weges beitragen werden, auf dem das Chlorophyll und verwandte Verbindungen Lichtquanten in chemisches Potential umzuwandeln vermögen, welches dann die Kohlenhydratsynthese treibt.

Schon vor 1940 hatte man die Vorstellung gewonnen, daß die Reduktion des Kohlendioxyds eine von der Umwandlung der Lichtquanten verschiedene Dunkelreaktion sein könnte. Dies hatte sich vor allem aus den vergleichenden biochemischen Untersuchungen von *Cornelius van Niel* ergeben sowie aus den viel früheren Arbeiten von *F. F. Blackman* und ihrer Interpretation durch *Otto Warburg*. Die lichtinduzierte Bildung molekularen Sauerstoffs erwies sich als chemisch und physikalisch von der CO_2 -Reduktion getrennt, als es *Robert Hill* [4] gelang, belichtete Chloroplasten mit Eisen(III)-Ionen statt CO_2 als Oxydationsmittel Sauerstoff entwickeln zu lassen.

Wir können die Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie (in Form von Kohlenhydrat und Sauerstoff) also durch das in Abbildung 1 wiedergegebene Schema darstellen: Licht wird vom Chlorophyll und von verwandten Pigmenten absorbiert und durch die Bildung energiereicher Verbindungen (B) in chemisches Potential umgewandelt. Diese wiederum führen

[4] *R. Hill*, *Nature* (London) 139, 881 (1937).

zur Bildung von Sauerstoff aus Wasser und gleichzeitig von Reduktionsmitteln $[H]$ mit hohem Reduktionspotential, die unter Beteiligung weiterer Substanzen die Reduktion des Kohlendioxyds ermöglichen.

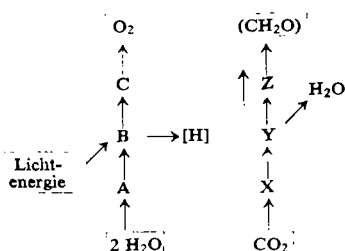


Abb. 1. Schematische Darstellung der Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie bei der Photosynthese. Erklärung siehe Text

Als prinzipielle Schwierigkeit erwies sich die Tatsache, daß sowohl die „Maschinerie“, die CO_2 in Kohlenhydrat umwandelt, als auch die Zwischenstufen, die bei dieser Umwandlung auftreten, aus den gleichen Atomen bestehen, nämlich im wesentlichen aus Kohlenstoff, Sauerstoff und Wasserstoff. Gewöhnliche analytische Methoden gestatten also nicht, zwischen „Maschine“ und Substrat zu unterscheiden. 1940 brachte die Entdeckung des langlebigen Kohlenstoff-Isotops ^{14}C durch Samuel Ruben und Martin Kamen [5] das ideale Hilfsmittel für die Untersuchung des Weges X, Y, Z (Abb. 1), auf dem Kohlenhydrat aus CO_2 entsteht.

1945 wurde ^{14}C dank der Errichtung von Kernreaktoren billig und in großer Menge zugänglich. Auf Anregung und mit Unterstützung von Professor Ernest O. Lawrence, Direktor des Radiation Laboratory in Berkeley, begannen wir mit Hilfe von radioaktivem Kohlenstoff den Teil der photosynthetischen Energieumwandlung zu untersuchen, der in der Reduktion des Kohlendioxyds besteht.

Experimentelles

Das Prinzip unserer Experimente war einfach: wir wußten, daß das von den Pflanzen aufgenommene Kohlendioxyd schließlich in allen Stoffen erscheint, aus denen die Pflanze besteht, daß es aber vor allen Dingen und zunächst im Kohlenhydrat auftritt. Wir wollten die Zeit, die dem aufgenommenen $^{14}CO_2$ zu Umwandlungen blieb, nach und nach herabsetzen, so daß wir anhand des sukzessiven Auftretens der Radioaktivität in aufeinanderfolgenden Verbindungen schließlich den ganzen Weg vom CO_2 zum Kohlenhydrat erkennen konnten.

Erste Versuche bestätigten die Hypothese, daß die Aufnahme des Kohlendioxyds und seine Umwandlung in organisches Material eine Dunkelreaktion sei: wir setzten Pflanzen in Abwesenheit von CO_2 dem Licht aus, so daß ein Teil der intermediär entstehenden energiereichen Verbindungen erhalten blieb. Diese Verbindungen ermöglichten anschließend im Dunkeln die

[5] S. Ruben u. M. D. Kamen, Physic. Rev. 57, 549 (1940).

Inkorporation relativ großer Mengen Kohlendioxyd. Unter diesen Bedingungen kam das aufgenommene CO_2 in der Reduktionskette jedoch nicht sehr weit, so daß wir weitere Versuche im „steady state“ der Photosynthese unternahmen.

Pflanzliches Material

In dem Maße, wie die Präzision unserer Experimente wuchs, wurde es wünschenswert, ein biologisches Material zu haben, mit dem sich reproduzierbar arbeiten ließ. Wir standen daher bald vor der Notwendigkeit, die benötigten Pflanzen selbst zu ziehen. Ein sehr bequem zu handhabender grüner Organismus, der schon häufig das Objekt photochemischer Untersuchungen war, ist die einzellige Grünalge *Chlorella* (Abbildung 2).

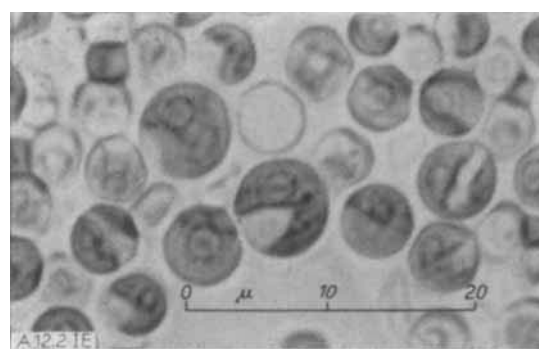


Abb. 2. *Chlorella*-Zellen. Vergrößerung etwa 10^5 -fach

Wir entwickelten Methoden zur reproduzierbaren Anzucht dieser Alge sowohl in kontinuierlicher als auch in unterbrochener Kultur und verwendeten *Chlorella*-Zellen in den meisten unserer Versuche. Es sei jedoch sogleich darauf hingewiesen, daß die wesentlichen Züge des Photosynthese-Cyclus, wie er sich schließlich ergab, an vielen photosynthetisierenden Organismen, von Bakterien bis zu den höheren Pflanzen, geprüft und bestätigt wurden.

Apparatives

Wir verwendeten für unsere Belichtungsversuche ein einfaches Gerät, das in Abbildung 3 gezeigt ist (und dem wir auf Grund seiner Gestalt den Namen „Lollipop“ gaben [*]). Dieses Gerät enthielt eine Algensuspension, die mit normalem CO_2 photosynthetisierte. Nach Erreichen des steady state wurde diesem normalen Kohlendioxyd entweder $^{14}CO_2$ zugemischt, oder es wurde gegen $^{14}CO_2$ ausgetauscht. Die Zeit, während der $^{14}CO_2$ auf die Algensuspension einwirken konnte, variierten wir zwischen Bruchteilen einer Sekunde und vielen Minuten. Am Ende dieser vorher festgelegten Zeitspanne wurden die Algen getötet, meist durch Eintropfen in das ungefähr vierfache Volumen Alkohol.

[*] Anm. d. Übers.: „Lollipop“ ist die Bezeichnung für Dauersüßigkeiten, die aus einer flachen, harten Bonbonmasse an einem dünnen Holzstab bestehen.

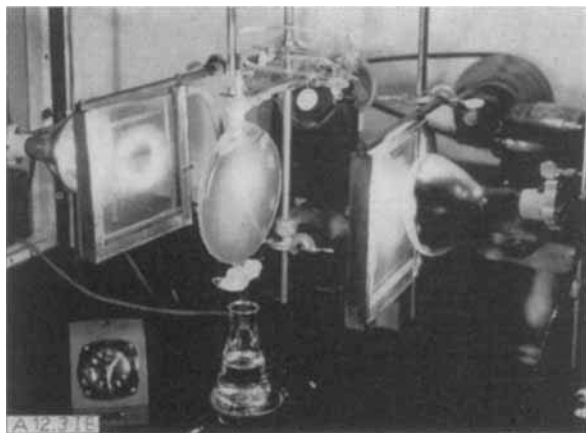


Abb. 3. Gerät für Photosyntheseversuche („Lollipop“)

Dieser brachte die enzymatischen Reaktionen zum Stillstand und begann gleichzeitig, die Zellen zu extrahieren.

Frühe analytische Methoden

Bei unseren frühen Untersuchungen verwendeten wir zur Isolierung und Identifizierung von Substanzen die Methoden der klassischen organischen Chemie. Es zeigte sich jedoch bald, daß wir mit diesen Verfahren nur langsam voran kamen und daß sich die radioaktiv markierten Verbindungen nur identifizieren ließen, wenn man sehr große Mengen pflanzlichen Materials aufarbeitete. Wir hatten jedoch während des Krieges Erfahrungen in der Trennung von Plutonium und anderen radioaktiven Elementen an Ionenaustauscher-Säulen gesammelt. Wir verwendeten also sowohl Anionen- als auch Kationen-Austauscher und fanden, daß der größte Teil der für uns interessanten Verbindungen, d.h. der nach kurzer Inkubationszeit radioaktiv markierten Stoffe, aus Anionen bestand. Diese Verbindungen ließen sich nur schwierig von Anionen-Austauschern eluieren, was dafür sprach, daß wir es mit starken Säuren zu tun hatten, die sehr wahrscheinlich mit mehr als einer anionischen Gruppe am Austauscher hafteten. Während sich eine gewöhnliche Carbonsäure relativ leicht eluieren ließ, mußte man für die Elution der Hauptmenge des radioaktiven Materials sehr starke Säuren oder sehr starke Basen verwenden. Dies zusammen mit einigen anderen chromatographischen Eigenschaften brachte uns auf den Gedanken, daß die früh radioaktiv werdenden Verbindungen esterartig gebundene Phosphatreste sowie Carboxylgruppen enthalten könnten. Eine detaillierte Analyse der Eluierungsbedingungen wies auf Phosphoglycerinsäure. Zu einer großen Menge Algen gaben wir dann als Indikator eine kleine Menge der gereinigten radioaktiven Substanz, die wir aus einer Algenprobe nach Inkubation mit $^{14}\text{CO}_2$ (wenige Sekunden) isoliert hatten. Anhand dieses Indikators konnten wir etwas mehr als 9 mg eines Bariumsalses gewinnen und dieses mit Verfahren der klassischen organischen Chemie als Bariumsals der 3-Phosphoglycerinsäure identifizieren [6].

[6] M. Calvin u. A. A. Benson, *Science* (Washington) 107, 476 (1948).

Etwa zu dieser Zeit hatten *Martin* und *Synge* [7] ihre Methode der Verteilungschromatographie entwickelt, die sich – infolge der Empfindlichkeit des colorimetrischen Nachweises – besonders zur Analyse von Aminosäuren eignet. Sie wurde unser wichtigstes analytisches Hilfsmittel und erwies sich als äußerst brauchbar, denn sobald wir unser unbekanntes Substanzgemisch durch zweidimensionale Chromatographie über das Papier verteilt hatten, konnten wir die radioaktiven Verbindungen finden, ohne ihre chemische Natur zu kennen, einfach indem wir das Papier mit einem photographischen Film bedeckten, der durch die Strahlung des radioaktiven Zerfalls dort geschwärzt wurde, wo die von uns gesuchten Substanzen saßen. Das Ergebnis eines solchen Versuches zeigt Abbildung 4. Algen wurden unter Bedingungen, die wir damals als steady state ansahen, 30 sec mit radioaktivem CO_2 inkubiert. Die geschwärzten Stellen des Films entsprechen den Stellen des Papiers, an denen sich radioaktive Substanzen befanden. Chromatogramme und Filme der in Abbildung 4 gezeigten Art waren unsere wichtigsten Informationsquellen.

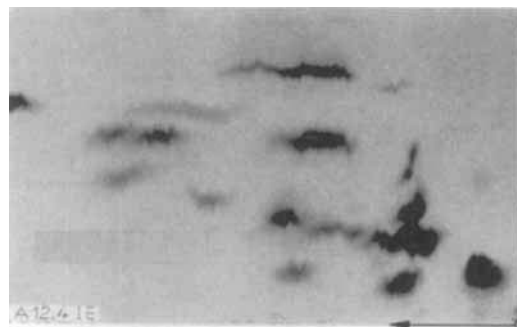


Abb. 4. Zweidimensionales Papierchromatogramm eines *Chlorella*-Extraktes nach 30 sec Photosynthese der Zellen mit $^{14}\text{CO}_2$ (vgl. Abb. 5)

Die Information, die diese Radioautogramme hergeben, besteht aus Zahl, Position und Intensität der geschwärzten Stellen. Letztere ist ein Maß für die Radioaktivität, die sich an dieser Stelle auf dem Papier befindet. Unglücklicherweise druckt der Film nicht auch zugleich die Namen der Verbindungen, und unsere Hauptaufgabe in den nächsten 10 Jahren bestand darin, herauszufinden, welchen Substanzen die geschwärzten Stellen entsprachen.

Die Techniken dafür waren zahlreich und vielfältig. Man wußte bereits, daß die Koordinaten einer Verbindung auf einem entwickelten Chromatogramm nach allgemeinen Regeln von der chemischen Struktur abhängen, aber das genügte für unsere Zwecke bei weitem nicht. Gewöhnlich suchten wir unter den chromatographierten Stoffen nach besonderen Eigenschaften, wie Fluoreszenz oder – wenn genug Substanz vorhanden war – einer charakteristischen UV-Absorption. Im allgemeinen aber war es nötig, die Verbindung aus dem Teil des Chromatogramms zu eluieren, den die Schwär-

[7] A. J. P. Martin: Les Prix Nobel. Stockholm 1952; R. L. M. Synge: Les Prix Nobel. Stockholm 1952.

zung des Films angab, das eluierte Material chemisch zu verändern und das Produkt erneut zu chromatographieren.

Aus einer Folge solcher Maßnahmen ergab sich allmählich die chemische Natur der ursprünglichen Substanz. Zur schließlichen Identifizierung wurde eine Spur der unbekannten Verbindung zusammen mit einer größeren Menge authentischen Materials der vermuteten Struktur chromatographiert. Eine auf dem Papier ausgeführte chemische Reaktion ergab dann die Position der authentischen Substanz (die allein reagierte, da nur sie in genügender Menge auf dem Papier vorhanden war). Stimmte diese Position in allen Einzelheiten mit der Lage der Radioaktivität im Chromatogramm überein, so konnten wir der Identität zwischen radioaktiver Substanz und authentischem Material recht sicher sein.

Auf diese Weise gelang es uns in etwa zehnjähriger Arbeit zusammen mit vielen Studenten und Mitarbeitern (angefangen bei Dr. *Andrew A. Benson*), eine große Zahl der schwarzen Flecke in Abbildung 4 mit Namen zu versehen, wie es Abbildung 5 zeigt. Es sei angemerkt, daß

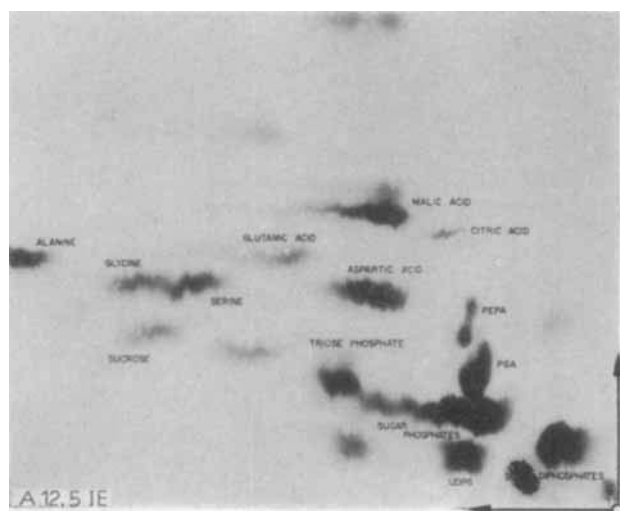


Abb. 5. Zweidimensionales Papierchromatogramm eines *Chlorella*-Extraktes nach 30 sec Photosynthese der Zellen mit $^{14}\text{CO}_2$ (vgl. Abb. 4). PEPA = Phosphoenolpyruvat; PGA = Phosphoglycerinsäure; UDPG = Uridin-diphosphoglucose

diese beiden Abbildungen nicht ein und dasselbe Chromatogramm wiedergeben, sondern zwei Chromatogramme, die nebeneinander vom selben Extrakt erhalten wurden. Dies gibt eine Vorstellung von der Reproduzierbarkeit [8].

[8] Einzelheiten über die Aufklärung des Photosynthese-Cyclus siehe: a) *M. Calvin*, J. chem. Soc. (London) 1895 (1956); Angew. Chem. 68, 253 (1956); b) *J. A. Bassham* u. *M. Calvin*: The Path of Carbon in Photosynthesis. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey 1957; c) *M. Calvin* in *W. D. Claus*: Radiation Biology and Medicine. Addison-Wesley Publishing Co., Reading, Mass., 1958, Kap. 31; d) *M. Calvin* et al. in: Proceedings 2nd Geneva Conference on Peaceful Uses of Atomic Energy. Pergamon Press, London 1958, Bd. 24, S. 24; e) *M. Calvin* u. *J. A. Bassham* in: Handbuch der Pflanzenphysiologie. Springer-Verlag, Heidelberg 1960, Bd. V, Teil I, S. 884; f) *J. A. Bassham* u. *M. Calvin*: The Photosynthesis of Carbon Compounds. W. A. Benjamin Co., New York, N.Y., 1962.

Entwicklung des Photosynthese-Cyclus

Phosphoglycerinsäure als erstes Produkt

Unsere Versuche hatten ergeben, daß sich die mit dem Kohlendioxyd aufgenommene Radioaktivität schon nach 30 sec in einer großen Zahl von Verbindungen wiederfindet. Wir mußten die Inkubationszeit also weiter herabsetzen, um zu erkennen, in welche Substanzen das CO_2 zuerst eingebaut wird. Wir taten das systematisch, und das Ergebnis einer 5 sec dauernden Inkubation zeigt Abbildung 6.

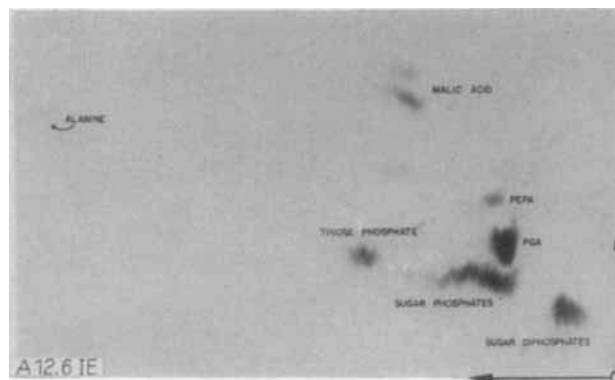


Abb. 6. Zweidimensionales Papierchromatogramm eines *Chlorella*-Extraktes nach 5 sec Photosynthese mit $^{14}\text{CO}_2$. Abkürzungen siehe Legende zu Abb. 5

Phosphate von Zuckern und oxydierten Zuckern beginnen hier vorzuherrschen. Bei noch kürzeren Inkubationszeiten (Bruchteilen einer Sekunde) überwiegt eine Substanz, die 80 bis 90 % der von den Algen aufgenommenen Radioaktivität in sich vereinigt. Diese Substanz ist Phosphoglycerinsäure. Daß sie nicht beim Töten der Zellen als Kunstprodukt entsteht, sondern auch in den lebenden Zellen vorhanden ist, zeigte folgender Versuch: Vorbelichtete Algen wurden im Dunkeln mit $^{14}\text{CO}_2$ inkubiert und die Bedingungen dabei so gewählt, daß die Reduktion von Phosphoglycerinsäure zu Zuckern möglichst gering blieb. Ein beträchtlicher Teil der C_3 -Verbindung trat dann als Alanin auf, was in Abbildung 7 zu erkennen ist.

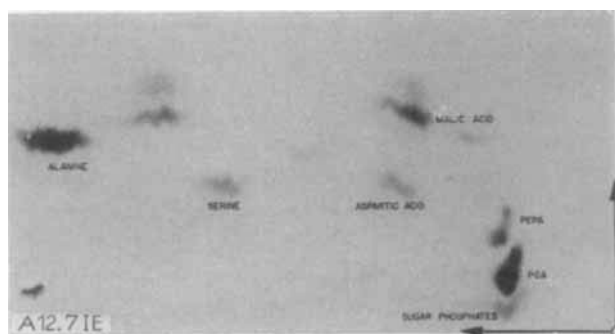


Abb. 7. Zweidimensionales Papierchromatogramm eines *Chlorella*-Extraktes. Die Zellen wurden nach einer Belichtungsperiode 20 sec im Dunkeln mit $^{14}\text{CO}_2$ inkubiert und anschließend extrahiert. Abkürzungen siehe Legende zu Abb. 5

Alanin ist eine stabile Substanz, deren natürlicher Vorrat in den Zellen groß ist. Es ist sehr unwahrscheinlich, daß es sich lediglich durch Eintropfen der Algen in

Alkohol in großer Menge aus instabilen Vorstufen bildet, deren natürlicher Vorrat gering ist. Wir konnten also sicher sein, daß es auch in den lebenden Algen auftritt. Außerdem führten verschiedene Tötungsverfahren zum gleichen Ergebnis, so daß auch die Anwesenheit von Phosphoglycerinsäure in den lebenden Zellen als sicher gelten kann.

Hexose-Synthese

Unter den Zuckerphosphaten, die besonders früh radioaktiv werden, sind – wie Abbildung 6 zeigt – Triose- und Hexosephosphate. So lag es nahe, eine Umwandlung der Phosphoglycerinsäure in eine Hexose anzunehmen. Um den Verlauf einer solchen Umwandlung zu klären, mußte zunächst die Frage beantwortet werden, welches der drei C-Atome der Phosphoglycerinsäure die Radioaktivität trägt. Sollte mehr als eine Position radioaktiv sein, so war weiter die Frage nach der Reihenfolge zu stellen, in der die Radioaktivität dort auftritt. Die gleichen Informationen brauchte man dann für die Hexose.

Phosphoglycerinsäure läßt sich – nach hydrolytischer Entfernung der Phosphatgruppe (gewöhnlich mit Säure) – leicht abbauen: Man oxydiert zunächst mit Perjodsäure unter Bedingungen, die das β -Kohlenstoffatom als Formaldehyd freisetzen. Der Formaldehyd wird als Dimedon-Derivat isoliert. Das restliche C_2 -Fragment liefert bei der Oxydation mit dem gleichen Reagens, oder besser mit Bleitetraacetat, CO_2 von der Carboxylgruppe und Ameisensäure vom α -Kohlenstoffatom. Beide werden getrennt und auf ihre Radioaktivität geprüft.

Wir konnten so zeigen, daß der größte Teil der Radioaktivität nach kürzester Zeit in der Carboxylgruppe der Phosphoglycerinsäure erscheint. Später tritt die Radioaktivität dann zu fast gleichen Teilen auch im α - und β -Kohlenstoffatom auf.

Ein Abbau der Hexose ergab, daß zuerst (und ungefähr gleichmäßig, obwohl nicht notwendig genau so) C-3 und C-4 markiert werden. Es folgen C-1 und C-2 sowie C-3 und C-6. Offenbar bestand also zwischen Phosphoglycerinsäure und der Hexose die in Abbildung 8 gezeigte Beziehung, d.h. Phosphoglycerinsäure wird zunächst zum Phosphoglycerinaldehyd reduziert, dieser

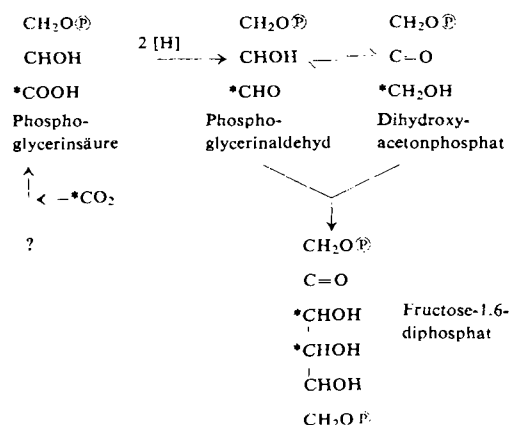


Abb. 8. Umwandlung von Phosphoglycerinsäure in Fructose-1,6-diphosphat
*C = radioaktiv markiertes Kohlenstoffatom

teilweise in das Keton umgewandelt, und beide kondensieren dann in einer Aldolase-Reaktion zum Fructose-1,6-diphosphat. Damit erscheint die Radioaktivität der Hexose im Zentrum des Moleküls.

Interessanterweise tritt schon nach relativ kurzen Inkubationszeiten eine Verbindung auf, die in beiden Richtungen des Chromatogramms (d.h. in beiden Lösungsmittelsystemen) nur sehr langsam wandert, besonders aber im sauren Lösungsmittel nahe beim Startpunkt bleibt (vgl. Abbildung 5). Schon bei sehr milder Hydrolyse entsteht aus dieser Verbindung Glucose. Die Hydrolyse gelingt noch leichter als beim Glucose-1-phosphat, aber die Verbindung ist mit diesem nicht identisch. Viel später konnte sie als Uridin-diphosphoglucose erkannt werden, und ihre Beteiligung an der Rohrzuckersynthese ergab sich aus dem spurenweisen Auftreten von Rohrzuckerphosphat, das wir bei einer späteren Suche fanden. Die Umwandlung von Phosphoglycerinsäure in Rohrzucker zeigt Abbildung 9.

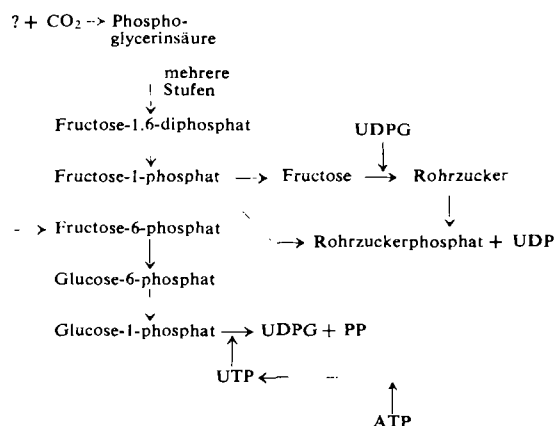


Abb. 9. Bildung von Rohrzucker aus Fructose-1,6-diphosphat
ATP = Adenosin-triphosphat; PP = Pyrophosphat; UDP = Uridin-diphosphat; UDPG = Uridin-diphosphoglucose; UTP = Uridin-triphosphat

Bildung der Phosphoglycerinsäure

Wir können uns jetzt der Frage nach der Bildung der Phosphoglycerinsäure zuwenden. Wir ließen uns von der einleuchtend erscheinenden Rechnung $2 + 1 = 3$ leiten und suchten nach einer aus zwei C-Atomen bestehenden Substanz, die das radioaktive CO_2 aufnehmen und so zu einer carboxyl-markierten C_3 -Verbindung, d.h. zur Phosphoglycerinsäure, führen würde. Wir suchten sehr gründlich und viele Jahre lang (wieder unter der Mitwirkung vieler Studenten und Gäste unseres Laboratoriums). Während sich unter sehr speziellen Bedingungen freie Glykolsäure zwar finden ließ, entsprach diese doch nicht dem, was von einem CO_2 -Acceptor zu erwarten war. Viele andere Verbindungen wurden im Lauf dieser Untersuchung nachgewiesen, darunter vor allem ein C_5 -Zucker, Ribulose, als Mono- und Diphosphat, sowie ein C_7 -Zucker, Sedoheptulose, gleichfalls in Form seines Mono- und Diphosphates.

Während die zeitliche Aufeinanderfolge von Phosphoglycerinsäure, Triosen und Hexose geklärt war, ließ sich ein zeitlicher Zusammenhang zwischen C_5 - und C_7 -Zucker nicht ohne weiteres finden. Vielmehr führten

Versuche, einen solchen Zusammenhang aus kinetischen Kurven für das Auftreten beider Zucker zu konstruieren zu Ergebnissen, die von Tag zu Tag, von Experiment zu Experiment und von Person zu Person variierten.

Radioaktivität der Pentose und Heptose

Als nächstes bestimmten wir daher die Verteilung der Radioaktivität in der Pentose und Heptose. In Abbildung 10 ist diese Verteilung durch die Zahl der Sterne an den Kohlenstoffatomen wiedergegeben. Man erkennt, daß C-3 der Ribulose als erstes radioaktiv wird. Ihm folgen C-1 und C-2 sowie schließlich C-4 und C-5. In der Sedoheptulose tritt die Radioaktivität zuerst in den drei mittleren Positionen (C-3, C-4 und C-5) auf, später in C-1 und C-2 sowie in C-6 und C-7. Nach Inkubationszeiten von Bruchteilen einer Sekunde ist die Radioaktivität in Position 4 der Sedoheptulose nur gering.

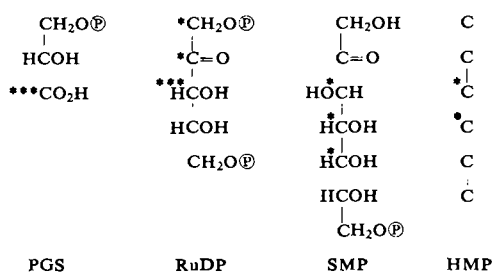


Abb. 10. Verteilung der Radioaktivität (*C = ^{14}C) in PGS = Phosphoglycerinsäure, RuDP = Ribulose-diphosphat, SMP = Sedoheptulose-monophosphat und HMP = Hexose-monophosphat. Die Zahl der Sterne deutet die Stärke der Radioaktivität an

Das Radioaktivitätsmuster in der Sedoheptulose und die Tatsache, daß nicht ein einzelnes Kohlenstoffatom stärker markiert ist als die restlichen sechs, spricht deutlich gegen eine Bildung der Heptose nach dem Schema $\text{C}_6 + \text{C}_1$, d.h. durch Addition eines einzelnen C-Atoms an eine Hexose. Es bleiben die Möglichkeiten $\text{C}_5 + \text{C}_2$ und $\text{C}_4 + \text{C}_3$. Die nahezu gleiche Radioaktivität der mittleren drei C-Atome der Sedoheptulose zeigt, daß das Schema $\text{C}_5 + \text{C}_2$ nicht in Frage kommt, da keine fünf zusammenhängenden Kohlenstoffatome in der Heptose das gleiche Radioaktivitätsmuster aufweisen, wie es in der Ribulose vorhanden ist.

Wir mußten uns also nach einer Verwirklichung des Schemas $\text{C}_4 + \text{C}_3$ umsehen. Ein C_3 -Fragment ist die Phosphoglycerinsäure. Die Hexose könnte Quelle des C_4 -Fragmentes sein, dessen Vereinigung mit einem von der Phosphoglycerinsäure direkt abgeleiteten C_3 -Partner zur Sedoheptulose mit dem in Abbildung 10 gezeigten Radioaktivitätsmuster führt. Die C_4 -Komponente müßte aus den Kohlenstoffatomen 3 bis 6 der Fructose bestehen (C-3 und C-4 sind radioaktiv, vgl. Abbildung 8) und sich in der aus Abbildung 11 ersichtlichen Weise mit Dihydroxyacetonphosphat kondensieren (Aldol-Kondensation). Wenn der Tetrose- und Triose-Vorrat der Zellen sehr klein ist, sollte sich so sehr schnell eine Heptose bilden, deren mittlere drei Kohlenstoffatome nahezu gleichmäßig markiert sind. Allerdings treten, wie erwähnt, bei sehr kurzen Inkubationszeiten Abweichungen auf. Das aus C-1

und C-2 der Fructose bestehende C_2 -Bruchstück reagiert mit einem anderen Triose-Molekül zu einer in Position 3 markierten Pentose (Abb. 11).

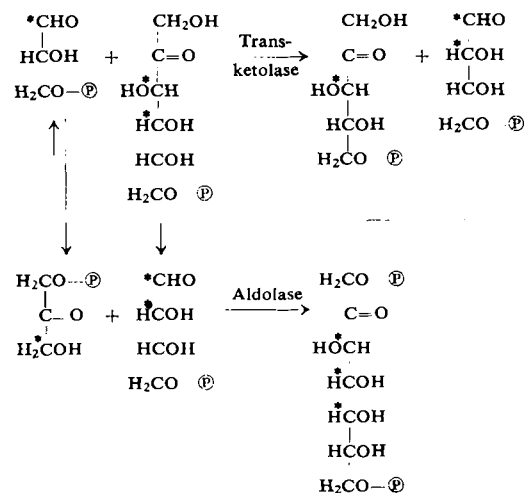


Abb. 11. Bildung einer Heptose aus einer Triose und einer Hexose
*C = radioaktiv markiertes Kohlenstoffatom

Bildung der Pentose

Nimmt man an, daß sich die Heptose tatsächlich auf dem soeben skizzierten Weg bildet, so bleibt die Frage nach der Entstehung der Pentose mit ihrem unsymmetrischen Radioaktivitätsmuster (Abb. 10). Bleiben wir bei unserer einfachen Arithmetik: Möglich ist, daß die Hexose ein C_1 -Fragment verliert, oder daß sich kleinere Verbindungen nach $\text{C}_4 + \text{C}_1$ oder $\text{C}_3 + \text{C}_2$ zur größeren zusammenfügen. Nun finden sich in der Hexose aber keine fünf zusammenhängenden Kohlenstoffatome, die das gleiche Radioaktivitätsmuster aufweisen, wie es die Pentose hat. Damit fällt die erste Möglichkeit (Bildung der Pentose durch Verlust eines endständigen C-Atoms der Hexose) aus, abgesehen davon, daß diese Bildungsweise infolge des Auftretens eines C_1 -Fragmentes einen Schritt rückwärts in unserem Bauprogramm bedeuten würde. Es bleibt also nur das Schema $\text{C}_3 + \text{C}_2$ für die Konstruktion der Pentose übrig. Wieder ist die Quelle der C_3 -Einheit klar. Aber die Herkunft des C_2 -Fragmentes, das sich mit ihr verbinden soll, bedarf der Diskussion.

Es sei daran erinnert, daß uns in Abbildung 11 eine in Position 3 radioaktive C_5 -Verbindung bereits begegnet ist. Das in Abbildung 10 wiedergegebene Schema für die Markierung der Ribulose zeigt, daß die Radioaktivität in C-3 stärker ist als in C-1 und C-2. Wir hatten die Ribulose aus Ribulose-1,5-diphosphat erhalten. Erst als uns klar wurde, daß dieses offenbar auf zwei Wegen entsteht, konnten wir ein Schema der zu seiner Bildung führenden Reaktionen entwerfen: Nimmt man an, daß sich die ersten zwei C-Atome der Sedoheptulose mit Phosphoglycerinaldehyd vereinigen, so erhält man zwei C_5 -Verbindungen, die zusammen das im Ribulose-1,5-diphosphat beobachtete Radioaktivitätsmuster ergeben. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 12 dargestellt.

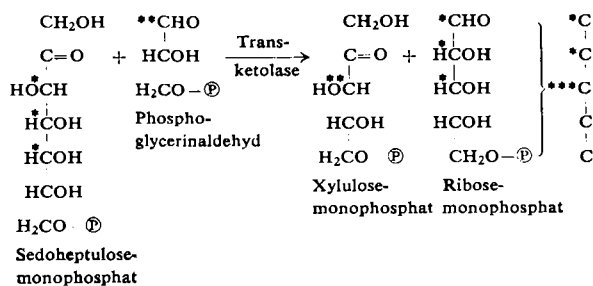


Abb. 12. Entstehung der im Ribulose-1,5-diphosphat beobachteten Radioaktivitätsverteilung.

*C = radioaktiv markiertes Kohlenstoffatom. Die Zahl der Sterne deutet die Stärke der Radioaktivität an

Das Enzym, das diese Übertragung eines C₂-Fragmentes katalysiert, heißt Transketolase. Es ist dasselbe Enzym, das die zur Heptose-Synthese benötigte Tetrose liefert (Abb. 11).

Wir kennen damit die Reaktionen, die – ausgehend von der Phosphoglycerinsäure – zu den früh im Chromatogramm auftretenden Zuckern führen: zur Triose, zu den verschiedenen Pentosen und Hexosen sowie zur Heptose. Daß es uns zunächst nicht gelang, die Aufeinanderfolge dieser Zucker festzustellen, erklärt sich rückblickend durch die Tatsache, daß Pentose, Hexose und Heptose gleichzeitig entstehen, sobald sich die Triose gebildet hat. Unbekannt geblieben ist jedoch immer noch die (ursprünglich für eine C₂-Verbindung gehaltene) Substanz, die mit dem ¹⁴CO₂ zur carboxylmarkierten Phosphoglycerinsäure reagiert.

CO₂-Acceptor

Um schließlich auch diese Substanz noch zu identifizieren, unternahmen wir andersartige Versuche: wir hatten bald bemerkt, daß die Radioaktivität der bisher genannten Verbindungen (außer Rohrzucker) sehr rasch einen oberen Grenzwert erreicht. Die Menge dieser Verbindungen in den Algenzellen ist zu jeder Zeit klein und ändert sich nicht. Dies gab uns die Möglichkeit zu untersuchen, wie die Bildung der Phosphoglycerinsäure von der Belichtung abhängt und auf welchem Weg die Säure entsteht. Wir konnten nämlich die Radioaktivität der Zwischenstufen, in denen das Kohlendioxid auftritt, als Maß für ihre Konzentration in den Zellen benutzen und konnten prüfen, wie sich diese Konzentrationen bei einer Änderung äußerer Variablen verhalten.

Am einfachsten war es, die Belichtung der Zellen zu ändern. In Abbildung 13 sind Versuche von P. Massini wiedergegeben. Man erkennt nicht nur die frühe ¹⁴C-Sättigung, sondern auch den Einfluß von Licht und Dunkelheit auf die Konzentration der Zwischenprodukte in den Zellen [9].

Phosphoglycerinsäure und Zuckerphosphate erreichen die ¹⁴C-Sättigung im Gegensatz zum Rohrzucker sehr rasch. Schaltet man das Licht aus, so steigt die Konzentration der Phosphoglycerinsäure sofort steil an, während gleichzeitig die Konzentration der Diphosphate (vor allem des Ribulose-1,5-diphosphates) abfällt. Dies gab

[9] M. Calvin u. P. Massini, *Experientia* 8, 445 (1952).

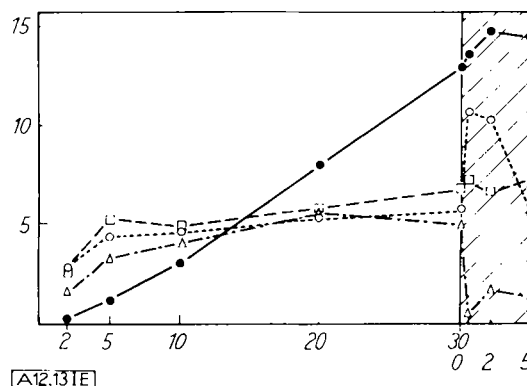


Abb. 13. Einfluß von Licht und Dunkelheit (schraffiertes Feld) auf den Gehalt der Algenzellen an:

Δ — — — Δ Diphosphaten; ○ — — — ○ Phosphoglycerinsäure
□ — — — □ Monophosphaten (Hexosemonophosphat-Fleck)
● — — — ● Rohrzucker

Ordinate: Imp./min (× 10⁻³) auf dem Papierchromatogramm
Abszisse: Dauer der Inkubation mit ¹⁴CO₂ [min]

uns den ersten deutlichen Hinweis auf die Bildungsweise der Phosphoglycerinsäure: offenbar entsteht sie in einer Dunkelreaktion aus Ribulose-1,5-diphosphat und Kohlendioxid.

Die Abbildungen 14 und 15 (nach Arbeiten von Dr. J. A. Bassham [10, 11]) zeigen, was diese Technik leistet, wenn man sie anzuwenden versteht. Man kann Meßpunkte in großer Zahl und entsprechend glatte Kurven erhalten, die den Punkt der ¹⁴C-Sättigung klar erkennen lassen.

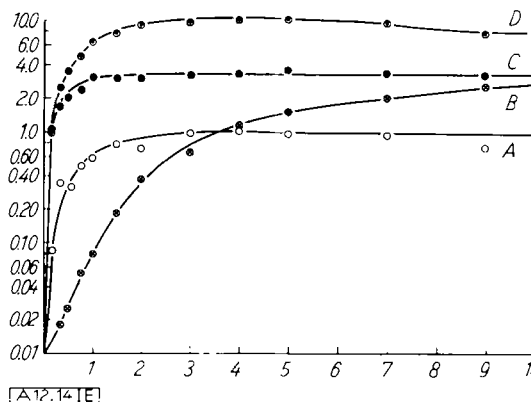


Abb. 14. Auftreten der Radioaktivität in (A) Diphosphaten, (B) Rohrzucker, (C) Phosphoglycerinsäure und (D) Hexose- und Heptosemonophosphaten

Ordinate: μMol ¹⁴C/ml Algen

Abszisse: Dauer der Inkubation mit ¹⁴CO₂ [min]

Aus Abbildung 15 ist abermals ersichtlich, daß beim Abschalten des Lichtes die Konzentration der Phosphoglycerinsäure auf Kosten des Ribulose-diphosphates ansteigt.

Wir können nunmehr den Reaktionscyclus formulieren, der von den im Licht gebildeten energiereichen Verbindungen getrieben wird und in dessen Verlauf Phosphoglycerinsäure umgesetzt und durch Reaktion von Ribulose-

[10] J. A. Bassham et al., *J. Amer. chem. Soc.* 76, 1760 (1954); M. Calvin u. J. A. Bassham: 1. International Conference on the Peaceful Uses of Atomic Energy, Genf 1955. Paper No. A/Conf. 8/P/259.

[11] J. A. Bassham u. M. R. Kirk, *Biochim. biophysica Acta* 43, 447 (1960).

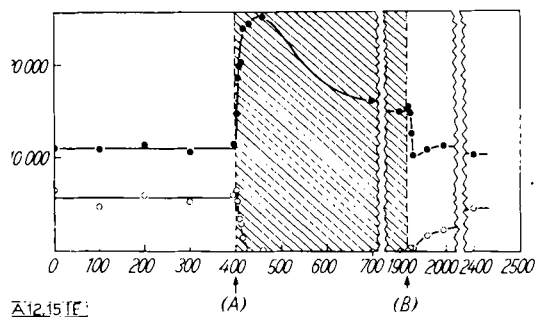


Abb. 15. Änderung der Konzentration von •—• Phosphoglycerinsäure und ○—○ Ribulose-1,5-diphosphat beim Abschalten (A) und Anschalten (B) des Lichtes. Schraffiertes Feld: Dunkelheit. Ordinate: Imp./min. Abszisse: Zeit [sec]

lose-diphosphat mit CO_2 zurückgebildet wird. Abbildung 16 zeigt das Schema dieses Cyclus.

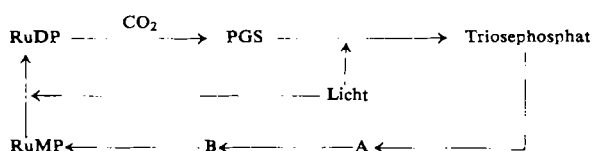


Abb. 16. Umsetzung und Rückbildung von Phosphoglycerinsäure (schematisch). A, B = Kondensationen und Umlagerungen; PGS = Phosphoglycerinsäure; RuDP = Ribulose-1,5-diphosphat; RuMP = Ribulose-monophosphat

Das aus Phosphoglycerinsäure entstandene Triosephosphat nimmt an einigen Kondensationen und Zucker-Umlagerungen teil (A und B in Abb. 16), zu denen u. a. die Bildung und weitere Umwandlung der Pentose und Heptose gehören. Diese Reaktionen führen schließlich zum Ribulose-monophosphat, dessen Phosphorylierung zum Ribulose-1,5-diphosphat den Kreis schließt.

Durch Ausschalten des Lichtes blockiert man die Umwandlung der Phosphoglycerinsäure zum Triosephosphat, ohne daß die Bildung der Phosphoglycerinsäure aus Ribulose-1,5-diphosphat beeinflußt würde (Abb. 16). Die Bildung des Ribulose-diphosphates ist jedoch wieder vom Licht abhängig. Daraus folgt, daß beim Abschalten des Lichtes der Phosphoglycerinsäure-Gehalt der Zellen steigen und der Ribulosediphosphat-Gehalt fallen muß.

Das in Abbildung 16 wiedergegebene Schema gestattet auch vorauszusagen, was geschehen wird, wenn man im Licht, d. h. in Anwesenheit der für den Ablauf des Cyclus notwendigen energiereichen Verbindungen, plötzlich die CO_2 -Zufuhr herabsetzt und so die Umwandlung von Ribulose-diphosphat in Phosphoglycerinsäure blockiert. Ribulose (in Form seiner Phosphate) müßte sich in einem solchen Fall ansammeln, der Phosphoglycerinsäure-Vorrat würde abnehmen. Die Anhäufung von Ribulose-phosphaten sollte dann aber dazu führen, daß der Cyclus in rückwärtiger Richtung durchlaufen wird, so daß die Konzentrationen der Zwischenprodukte zu oszillieren beginnen. Abbildung 17 (nach Versuchen von Dr. A. T. Wilson [12]) zeigt, daß diese Erscheinung tatsächlich auftritt.

[12] A. T. Wilson u. M. Calvin, J. Amer. chem. Soc. 77, 5948 (1955).

Die plötzliche Verminderung der CO_2 -Zufuhr resultiert im Abfall der Phosphoglycerinsäure-Konzentration und im Anstieg der Ribulosephosphate. Es entspricht

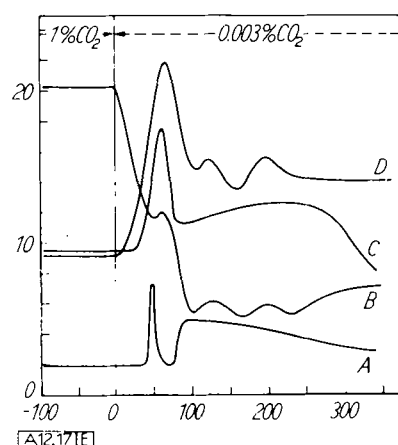


Abb. 17. Änderung der Konzentrationen von (A) Triosephosphat ($\times 20$), (B) Phosphoglycerinsäure, (C) Ribulose-monophosphat ($\times 10$) und (D) Ribulose-1,5-diphosphat bei plötzlicher Verminderung der CO_2 -Zufuhr

Ordinate: Relative Konzentration in den Zellen
Abszisse: Zeit [sec] bei 6°C

der Position, welche die Triose im Cyclus einnimmt, daß ihre Konzentration als letzte zunimmt und als erste abfällt.

Der Photosynthese-Cyclus

Wir können jetzt die bisher getrennt besprochenen Reaktionsschritte zum vollständigen Photosynthese-Cyclus zusammenfügen (Abbildung 18).

Dieser Cyclus enthält zwischen dem Ribulose-1,5-diphosphat und der Phosphoglycerinsäure eine noch nicht erwähnte Substanz: eine verzweigte α -Hydroxy- β -keto-carbonsäure. Es gelang uns bis jetzt nicht, diese Verbindung zu isolieren. Zwar konnten wir das Enzym Carboxydismutase, das die Umwandlung von Ribulose-diphosphat in Phosphoglycerinsäure katalysiert, gewinnen und reinigen, aber wir konnten diese Umwandlung bisher nicht in zwei Schritte zerlegen [13]. Wenn das in Abbildung 18 angenommene Zwischenprodukt existiert, so kann es in freier Form (wenn überhaupt) nur in sehr kleiner Menge vorhanden sein, und seine Hydrolyse zu zwei Molekülen Phosphoglycerinsäure muß in vitro und in vivo eine extrem schnelle Reaktion sein. Den vermutlichen Verlauf der Carboxydismutase-Reaktion zeigt Abbildung 19.

Diesem Schema liegt die Annahme zugrunde, daß das Zwischenprodukt hydrolytisch in zwei Moleküle Phosphoglycerinsäure gespalten wird. In einem früheren Stadium unserer Arbeiten zogen wir auch die Möglichkeit einer reduktiven Spaltung zu je einem Molekül Triose und Phosphoglycerinsäure in Betracht. Diese Möglichkeit wurde dann verworfen, da wir keine Spur

[13] N. G. Pon, Dissertation, University of California, Berkeley 1960.

Umwandlung von Lichtenergie in chemisches Potential

Wie man aus den verschiedenen Darstellungen des Photosynthese-Cyclus (Abb. 18 und 20) erkennt, wird die Energie, die zur Synthese der Kohlenhydrate und vieler anderer Stoffe durch Reduktion des Kohlendi-

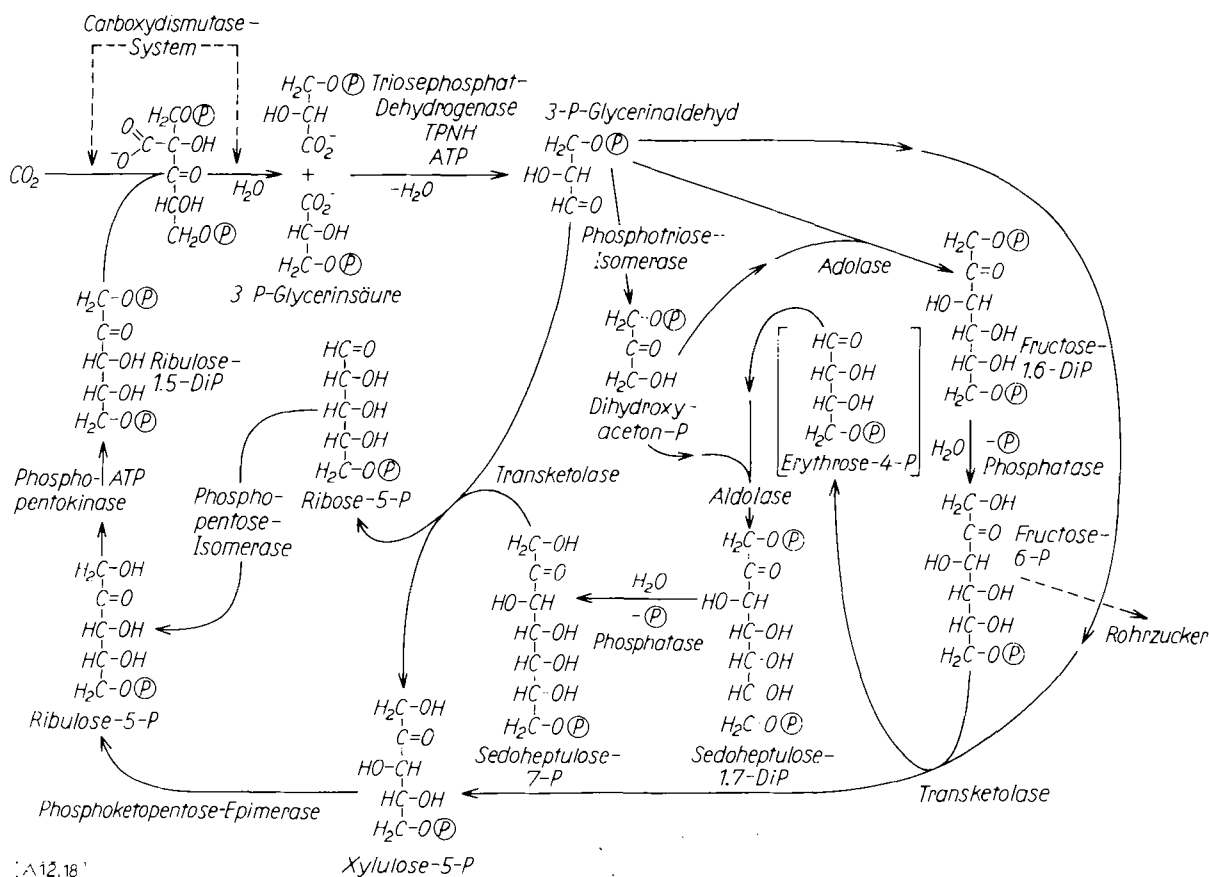


Abb. 18. Photosynthese-Cyclus

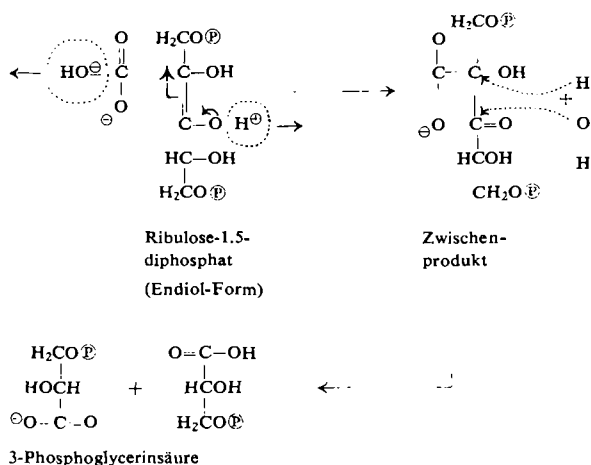


Abb. 19. Vermutlicher Verlauf der Carboxydismutase-Reaktion

oxyds notwendig ist, in Form von Verbindungen mit relativ hohem chemischem Potential zur Verfügung gestellt. Insbesondere handelt es sich dabei um reduziertes Triphospho-pyridinnucleotid (TPNH) und um Adenosin-triphosphat (ATP), deren Strukturen in Abbildung 21 wiedergegeben sind.

Diese beiden Verbindungen ermöglichen den Ablauf des Photosynthese-Cyclus im Dunkeln, sofern alle notwendigen Enzyme und Substrate vorhanden sind [15]. Die vom Chlorophyll absorbierte Lichtenergie muß also so umgewandelt werden, daß sie schließlich zur Synthese der genannten zwei Substanzen zur Verfügung steht.

Daß Lichtenergie unabhängig von der CO₂-Reduktion und der Reoxydation der dabei entstehenden Produkte in chemisches Potential übergeführt, d.h. zur Synthese von ATP verwendet werden kann, zeigen die Versuche von Goodman und Bradley [16] mit ganzen Zellen. Frenkel [17] konnte an bakteriellen Chromatophoren

[15] E. Racker, *Nature* (London) 175, 249 (1955).

[16] M. Goodman, D. F. Bradley u. M. Calvin, J. Amer. chem. Soc. 75, 1962 (1953).

[17] A. Frenkel, J. Amer. chem. Soc. 76, 5568 (1954).

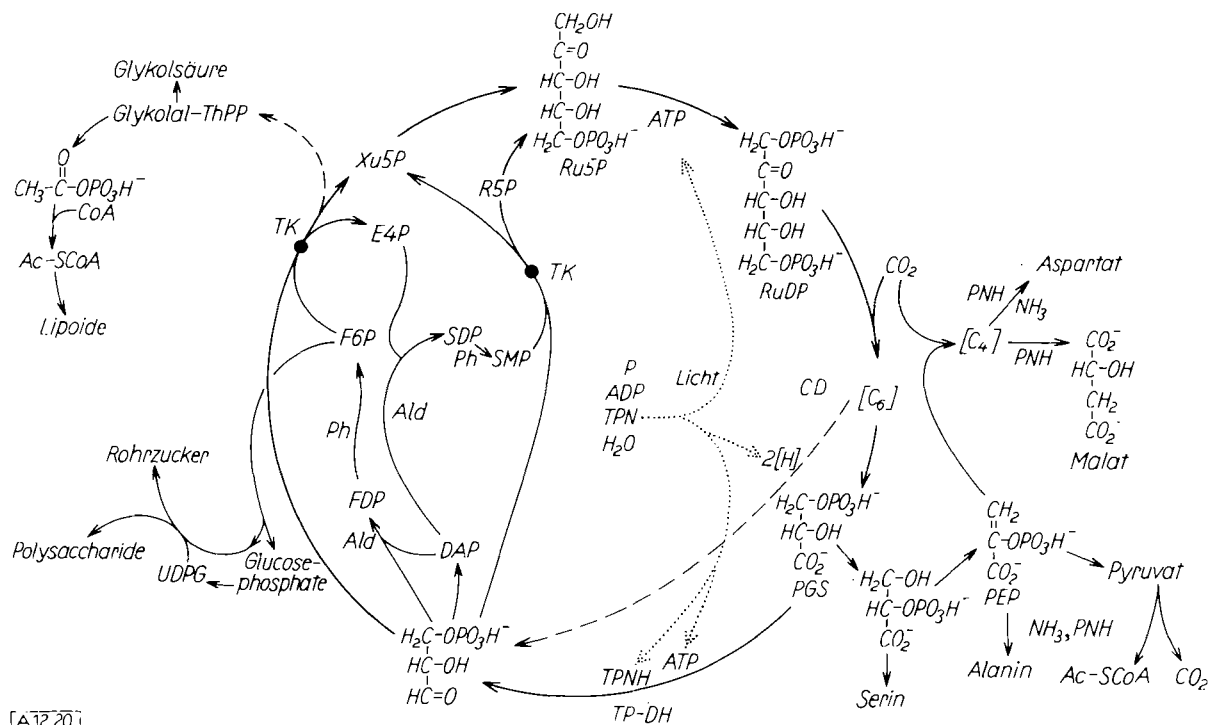


Abb. 20. Beziehungen zwischen Photosynthese-Cyclus, Umwandlung von Lichtenergie in chemisches Potential (punktierte Pfeile) und weiteren biosynthetischen Reaktionen

Ac-SCoA = Acetyl-Coenzym A

ADP = Adenosin-diphosphat

Ald – Aldolase

ATP = Adenosin-triphosphat

CD – Carboxydismutase

CoA = Coenzym A

DAP = Dihydroxyacetonphosphat

E4P = Erythrose-4-phosphat

FDP = Fructose-1.6-diphosphat

F6P = Fructose-6-phosphat

P = anorganisches Phosphat

PGS \rightarrow Phosphoglycerinsäure

PEP -- Phosphoenolpyruvat

Ph = Phosphatase

PNH = reduzierte Pyridinnucleotide

R 5 P = Ribose-5-phosphat

RuDP = Ribulose-1.5-diphosphat

Ru 5 P = Ribulose-5-phosphat

SDP = Sedoheptulose-1,7-diphosphat

SMP = Sedoheptulose-7-monophosphat

ThPP = Thiamin-pyrophosphat

TK = Transketolase

TP-DH = Triosephosphat-Dehydrogenase

TPN = Triphospho-pyridinnucleotid

TPNH = reduziertes Triphospho-pyridinnucleotid

UDPG = Uridindiphosphoglucose

Xu5P = Xylulose-5-phosphat

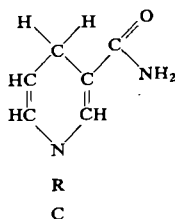
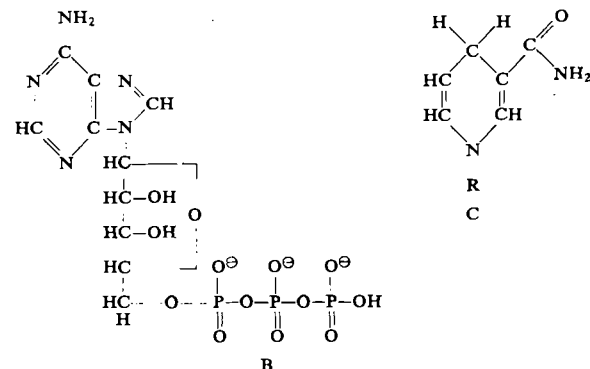
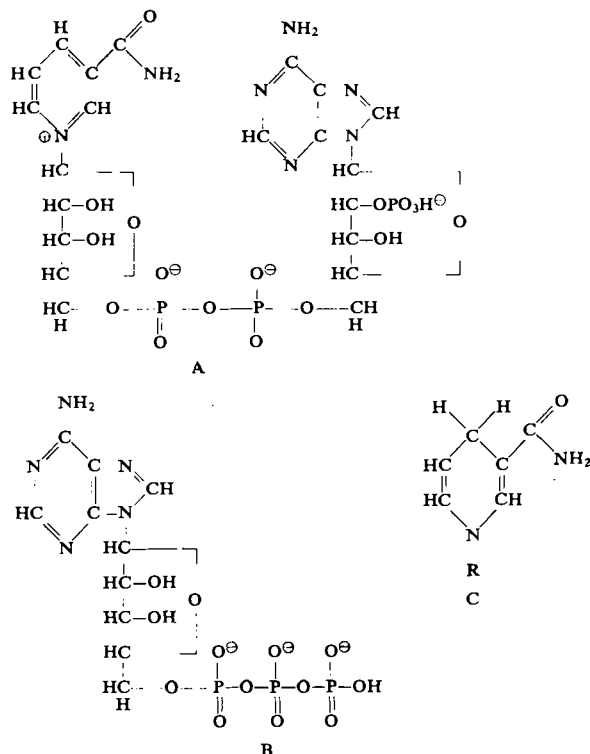


Abb. 21. Strukturen von (A) Triphospho-pyridinnucleotid, (B) Adenosin-triphosphat und (C) dem Nicotinamidteil des reduzierten Triphospho-pyridinnucleotids

erstmalig zeigen, daß diese Umwandlungen nicht an die Gegenwart von Sauerstoff gebunden sind. Ebenso konnte *Arnon* [18] die anaerobe ATP-Synthese in Chloroplasten grüner Pflanzen nachweisen. Daß Chloroplasten auch Pyridinnucleotide photoreduzieren können, bewiesen *Ochoa* und *Vishniac* [19]. Wie aber die Umwandlung der Lichtenergie in chemisches Potential (das dann in Dunkelreaktionen zur Synthese von ATP und TPNH dienen kann) im einzelnen verläuft, ist noch immer Gegenstand der Spekulation [20, 21].

Der „Apparat“, in dem sich die Energieumwandlung vollzieht, befindet sich in den Chloroplasten. Die Enzyme der CO_2 -Reduktion können – so weit wir sie bisher kennen – aus den Chloroplasten höherer Pflanzen mit Wasser leicht ausgewaschen werden. Der energieumwandelnde Apparat bleibt zurück. Er weist eine geordnete Struktur auf, d.h. elektronenoptisch dichte Schichten wechseln mit Schichten geringerer Dichte ab. Abbildung 22 gibt einige Beispiele.

[18] F. R. Whatley, M. B. Allen u. D. I. Arnon, *Biochim. biophysica Acta* 16, 605 (1955).

[19] *W. Vishniac u. S. Ochoa* in *W. D. McElroy u. B. Glass*: Phosphorus Metabolism. Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, 1952, Bd. II, S. 467.

[20] *M. Calvin*, J. theoretical Biol. 2, 258 (1961).

[21] *M. Calvin*, *Perspectives Biol. and Med.* 5, 147 (1962).

Auch diese Schichten sind in sich strukturiert, und es gelang erst kürzlich [22], ihre Struktur zu erkennen. Abbildung 23 zeigt eine Lamelle aus einem Spinat-Chloroplasten in Aufsicht.

Man sieht die körnige Beschaffenheit, die durch die Anwesenheit ziemlich gleichartiger, abgeplattet-kugelförmiger Gebilde hervorgerufen wird, die wir Quantasomen genannt haben. Innerhalb dieser Quantasomen

sind die Chlorophyll-Moleküle in hohem Grade geordnet, wofür vor allem ihr elektrischer Dichroismus spricht (Versuche von Dr. *Kenneth H. Sauer* [23]).

Wir versuchen jetzt festzustellen, was im einzelnen geschieht, nachdem das Chlorophyll ein Lichtquant absorbiert hat und dadurch in einen angeregten Zustand gelangt ist. Physiker, Physikochemiker, Organiker und Biochemiker arbeiten an der Lösung dieses Problems.

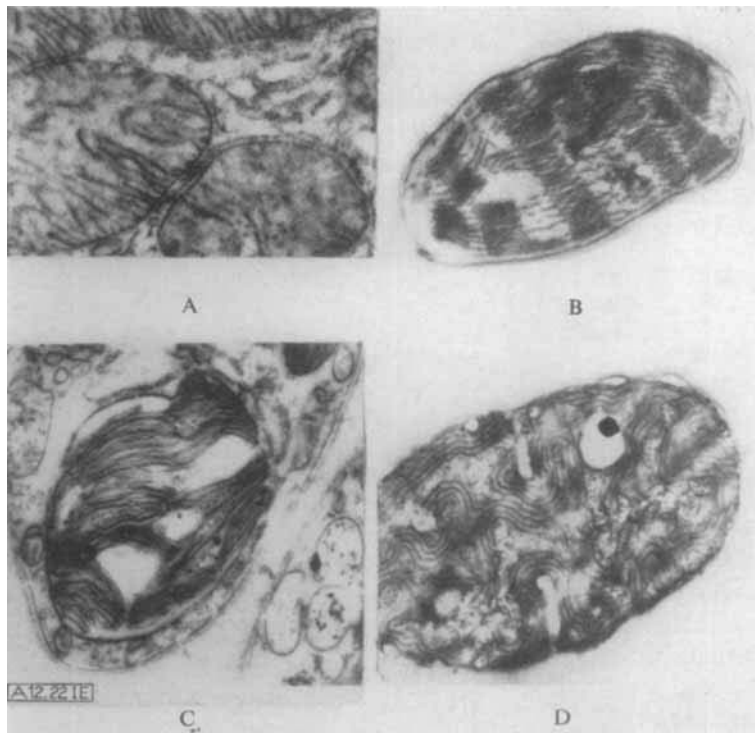


Abb. 22. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von (A) Mitochondrien aus Meerschweinchen-Pankreas, (B) Chloroplast aus einem Tabakblatt (24 bis 36 Stunden im Dunkeln gehalten, dann mit Permanganat fixiert), (C) Chloroplast und Mitochondrien aus *Chlamydomonas*, und (D) ganze Zelle von *Anabena*, in der die Lamellen sichtbar sind



Abb. 23. Quantasomen eines Spinat-Chloroplasten. Die weißen Kugeln sind Markierungspartikel (Polystyrol, 880 Å Durchmesser)

[22] *R. B. Park* u. *N. G. Pon*, *J. molec. Biol.* 3, 1 (1961).

Uns interessiert, welcher Art die nächste Stufe im Prozeß der Energieumwandlung ist. Entweder handelt es sich um eine Elektronenübertragung [20] ähnlich der in Mitochondrien [24] oder es ist ein Vorgang ohne Redox-Charakter [21]. Welche dieser beiden Möglichkeiten zutrifft, bleibt zu klären.

Die chemische Biodynamik, in der sich viele naturwissenschaftliche Disziplinen zusammenfinden, wird bei der Lösung dieser Frage ebenso eine Rolle spielen, wie sie es bei der Aufklärung des Photosynthese-Cyclus getan hat. Man darf erwarten, daß ihre Bedeutung in dem Maße wächst, wie es darum geht, die Dynamik lebender Organismen im molekularen Bereich zu verstehen.

Übersetzt von Dr. *H. Grünwald*, Heidelberg

Eingegangen am 3. Januar 1962 [A 186]

[23] *K. Sauer* u. *M. Calvin*, *J. molec. Biol.*, im Druck.

[24] *D. E. Green*: 5. International Congress for Biochemistry, Moskau 1961. Preprint 176.