

Über die Analyse der Photosynthese mit Blitzlicht [*]

VON H. T. WITT, B. RUMBERG, P. SCHMIDT-MENDE, U. SIGGEL,
B. SKERRA, J. VATER UND J. WEIKARD

MAX-VOLMER-INSTITUT FÜR PHYSIKALISCHE CHEMIE, TECHNISCHE UNIVERSITÄT BERLIN

Direkte Informationen über den Primärprozeß der Photosynthese gewinnt man durch Messung der sehr kurzlebigen Primär- und Zwischenprodukte mit Hilfe 1. der Blitzlichtphotometrie, 2. der periodischen Blitzlichtphotometrie und 3. der Blitzlichtmanometrie. – Die Analyse des Primärprozesses mit Hilfe dieser Methoden an normalen und durch chemische oder physikalische Eingriffe veränderten Pflanzenzellen und Chloroplasten ermöglichte die Aufstellung eines Reaktionsschemas für den Elektronentransport in der Photosynthese.

I. Überblick [**]

1. Gesamtprozeß

Von allen auf der Erde ablaufenden Reaktionen ist die Photosynthese in grünen Pflanzenzellen der am häufigsten vorkommende Prozeß. Bei Belichtung der Pflanzen werden Zucker und andere energiereiche Substanzen aus CO_2 und H_2O synthetisiert. Der Reaktionsweg vom CO_2 zum Zucker ist gut bekannt (Calvin-Cyclus) [5]. Über die Primärvorgänge, die diesen Prozeß antreiben, konnten erst in letzter Zeit genauere Vorstellungen gewonnen werden. Darüber wird hier berichtet.

2. Wasserspaltung

Die Primärvorgänge spielen sich in hochorganisierten Zellbestandteilen, den Chloroplasten, ab. Sie bestehen in der Umwandlung elektromagnetischer Energie in freie chemische Energie. Dabei wird mit der Energie des sicht-

baren Lichtes letzten Endes Wasser in Wasserstoff und Sauerstoff gespalten [6]. Der Sauerstoff entweicht in die Atmosphäre, der Wasserstoff wird auf Triphosphopyridinnucleotid (TPN) [***] übertragen [7]. Hill [8] entdeckte, daß die Wasserspaltung auch in isolierten, in Wasser aufgeschwemmten Chloroplasten abläuft, wenn man anstelle des natürlichen Wasserstoffakzeptors TPN künstliche Akzeptoren, z. B. Kaliumhexacyanoferrat(III), zusetzt.

3. Phosphorylierung

Gleichzeitig mit der Wasserspaltung wird im Primärvorgang nach Arnon et al. [9] aus ADP und Phosphat

[6] S. Ruben, M. Randall, M. D. Kamen u. J. L. Hyde, J. Amer. chem. Soc. 63, 877 (1941).

[***] Folgende Abkürzungen werden verwendet:

ADP = Adenosindiphosphat

ATP = Adenosintriphosphat

Asc = Ascorbat

Chl = Chlorophyll

CMU = N-p-Chlorphenyl-N-dimethylharnstoff

Cyt = Cytochrom

DPIP = 2,6-Dichlorphenol-indophenol (2,6-Dichlorchinon-4-p-hydroxyanil)

Fd = Ferredoxin

PMS = N-Methylphenazonium-methylsulfat

TPN = Triphosphopyridinnucleotid (= NADP)

TPNH = reduziertes Triphosphopyridinnucleotid (= NADPH_2)

Q = Plastochinon

[7] W. Vishniac u. S. Ochoa, Nature (London) 167, 768 (1951); L. J. Tolmach, ibid. 167, 946 (1951); D. I. Arnon, ibid. 167, 1008 (1951); A. San Pietro u. H. M. Lang, Science (Washington) 124, 118 (1956).

[8] R. Hill, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B, 127, 192 (1939).

[9] D. I. Arnon, M. B. Allen u. F. R. Whatley, Nature (London) 174, 394 (1954); Science (Washington) 127, 1026 (1958); A. W. Frenkel, J. Amer. chem. Soc. 76, 3568 (1954).

[*] Nach Vorträgen anlässlich der Hauptversammlung der Gesellschaft Deutscher Chemiker in Heidelberg am 10. September 1963 und der 63. Hauptversammlung der Deutschen-Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie in Berlin am 8. Mai 1964.

[**] Dieser Überblick beschreibt nur die Ergebnisse, die zum Verständnis des Folgenden notwendig sind. Allgemeine Referate über die Primärprozesse der Photosynthese siehe z. B. [1–4].

[1] M. D. Kamen: Primary Processes in Photosynthesis. Academic Press, New York, London 1963.

[2] J. A. Bassham, in F. F. Nord: Advances in Enzymology. Interscience, New York 1963, Bd. 25, S. 39.

[3] G. W. Robinson, Annual Rev. phys. Chem. 15, 311 (1964).

[4] A. Trebst, Ber. dtsch. botan. Ges. 77, 123 (1964).

[5] M. Calvin, Angew. Chem. 74, 165 (1962).

energiereiches ATP gebildet. TPNH und ATP reduzieren dann in chemischen Dunkelreaktionen CO₂ zu Zucker.

4. Chloroplastenstruktur

Das Zustandekommen der Photosynthese beruht auf der besonderen Anordnung der Moleküle in den Chloroplasten. Struktur und Zusammensetzung der Chloroplasten wurden daher ausführlich untersucht [10]. Man fand u.a. Cytochrom-f und Cytochrom-b [11], Plastochinon [12], Ferredoxin [13], Flavin [14], Mangan [15] und Plastocyanin [15a].

5. Aktives Chlorophyll und Energieleitung

Überraschenderweise sind nur ca. 0,1% des gesamten Chlorophylls photochemisch aktiv [16]. Die übrigen ca. 99,9% und die in den Chloroplasten enthaltenen Carotinoide sind so angeordnet, daß das von ihnen absorbierte Licht durch Energiewanderung zu den aktiven Chlorophyllmolekülen hingeleitet wird [17].

6. Quantenausbeute

Für die Quantenausbeute wurden Werte zwischen 3 [18] und 12 Quanten pro gebildetes Sauerstoffmolekül gefunden. Als wahrscheinlichster Wert gilt der von 8–10 Quanten [19].

7. Beteiligung von zwei Pigmentsystemen

Untersuchungen über die Sauerstoffausbeute in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Lichtes führten Emerson et al. [20–23] zu dem Ergebnis, daß an den

Primärvorgängen wahrscheinlich zwei Pigmentsysteme beteiligt sind. Dies wurde später auch aus Fluoreszenzmessungen geschlossen [24]. Es wurden verschiedene Hypothesen über das Emersonsche Phänomen aufgestellt [25,26], doch gelang eine experimentell fundierte Deutung zunächst nicht.

In den letzten Jahren wurden Verfahren entwickelt, die es gestatten, Primärvorgänge in den Chloroplasten direkt zu beobachten (Messungen der Fluoreszenz [24], Phosphoreszenz [27], Elektronenresonanz [28] und Absorption). Als sehr erfolgreich erwies sich die Messung von Absorptionsänderungen mit statischen (Gleichlicht) [29,30] und insbesondere mit dynamischen (Blitzlicht) [31,32] Methoden.

8. Zwei gekoppelte Lichtreaktionen

An Hand von Absorptionsänderungen konnten zunächst Kok [33], Duysens [34] und Witt et al. [35–37] direkt beweisen, daß zwei Pigmentsysteme mit zwei gekoppelten Lichtreaktionen an den Primärvorgängen beteiligt sind (Abschnitt VII). Dies wurde indirekt auch aus biochemischen Untersuchungen geschlossen [38].

9. Primär- und Zwischenprodukte

Durch statische Messungen von Absorptionsänderungen und vor allem durch dynamische Messungen bei Anregung mit Blitzlicht konnten neun Primär- und Zwischenprodukte der Photosynthese identifiziert werden (Abschnitt III).

[10] W. Menke, Annual Rev. Plant Physiol. 13, 27 (1962).

[11] R. Hill u. R. Scarisbrick, New Phytologist 50, 98 (1951).

[12] R. L. Lester u. F. L. Crane, J. biol. Chemistry 234, 2169 (1959).

[13] a) A. San Pietro u. H. M. Lang, Science (Washington) 124, 118 (1956); b) H. E. Davenport u. R. Hill, Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B, 139, 346 (1952); c) K. Tagawa u. D. I. Arnon, Nature (London) 195, 537 (1962).

[14] D. L. Keister, A. San Pietro u. F. E. Stolzenbach, Arch. Biochem. Biophysics 98, 235 (1962); M. Shin, K. Tagawa u. D. I. Arnon, Biochem. Z. 338, 84 (1963).

[15] E. Kessler, Planta 49, 435 (1957).

[15a] S. Katoh, Nature (London). 186, 533 (1960).

[16] R. Emerson u. W. Arnold, J. Gen. Physiol. 16, 191 (1932).

[17] H. Gaffron u. K. Wohl, Naturwissenschaften 24, 81 (1936); H. J. Dutton, W. M. Manning u. B. M. Duggar, J. phys. Chem. 47, 308 (1943); Th. Förster, Z. Naturforsch. 2b, 174 (1947); C. S. French u. V. K. Young, J. gen. Physiol. 35, 873 (1952); L. N. M. Duysens, Thesis, Utrecht 1952.

[18] O. Warburg u. G. Krippahl, Z. Naturforsch. 13b, 509 (1958).

[19] B. Kok.: Handbuch der Pflanzenphysiologie. Springer, Berlin 1960, Bd. 5, S. 566.

[20] R. Emerson, Annual Rev. Plant Physiol. 9, 1 (1958); R. Emerson, R. Chalmers, C. Cederstrand u. M. Brody, Science (Washington) 123, 673 (1956); R. Emerson, R. Chalmers u. C. Cederstrand, Proc. nat. Acad. Sci. USA 43, 133 (1957).

[21] L. R. Blinks, Plant Physiol. 34, 200 (1959); Proc. nat. Acad. Sci. USA 46, 327 (1960).

[22] J. Meyers u. C. S. French, J. gen. Physiol. 43, 723 (1960).

[23] R. Govindjee, J. B. Thomas u. E. Rabinowitch, Science (Washington) 132, 421 (1960); R. Govindjee u. E. Rabinowitch, ibid. 132, 355 (1960); Biophys. J. 1, 73 (1960); 2, 377 (1961).

[24] H. Kautsky, W. Appel u. H. Amann, Biochem. Z. 332, 277 (1960).

[25] J. Franck, Proc. nat. Acad. Sci. USA 44, 941 (1958).

[26] R. Hill u. F. Bendall, Nature (London) 186, 136 (1960).

[27] B. L. Strehler u. W. Arnold, J. gen. Physiol. 34, 809 (1952).

[28] B. Commoner, J. Heise u. J. Townsend, Proc. nat. Acad. Sci. USA 42, 710 (1956); M. Calvin, J. theoretical Biol. 1, 258 (1961).

[29] L. N. M. Duysens, Thesis, Utrecht 1952.

[30] B. Chance, J. biol. Chemistry 202, 383 (1953).

[31] H. T. Witt, Naturwissenschaften 42, 72 (1955), Z. Elektrochem. 59, 981 (1955); H. T. Witt, R. Moraw u. A. Müller, Z. physikal. Chem., N.F. 20, 193 (1959).

[32] H. Rüppel, V. Bültemann u. H. T. Witt, Ber. Bunsenges. physikal. Chem. 68, 340 (1964); 66, 760 (1962); H. Rüppel, Dissertation, Universität Marburg, 1962; H. T. Witt, Ber. Bunsenges. physikal. Chem. 64, 87 (1960).

[33] B. Kok u. G. Hoch in W. D. McElroy, u. B. Glass: Light and Life, The Johns Hopkins Press, Baltimore 1961, S. 397.

[34] L. N. M. Duysens, J. Ames u. B. M. Kamp, Nature (London) 190, 510 (1961).

[35] H. T. Witt, A. Müller u. B. Rumberg, Nature (London) 191, 194 (1961).

[36] H. T. Witt, A. Müller u. B. Rumberg, Angew. Chem. 73, 507 (1961).

[37] H. T. Witt, A. Müller u. B. Rumberg, Nature (London) 192, 967 (1961).

[38] M. Losada, F. R. Whatley u. D. I. Arnon, Nature (London) 190, 606 (1961).

10. Reaktionsschema

Mit Hilfe der Blitzlichtmethoden gelang es, Eigenschaften der Primär- und Zwischenprodukte, die Reihenfolge, in der sie durchlaufen werden, und die Kinetik ihrer Reaktionen zu ermitteln. Auf Grund dieser Ergebnisse war es möglich, ein Reaktionsschema aufzustellen, das die Bildung von TPNH, ATP und O₂ im einzelnen beschreibt (Abschnitt XIII).

II. Die Blitzlichtmethoden

Zur direkten Analyse der Primärvorgänge der Photosynthese müssen hochempfindliche und schnell anzeigende Verfahren benutzt werden, weil nur 0,1 % aller Chlorophyllmoleküle photochemisch aktiv sind und weil die Halbwertszeiten der Teilreaktionen nur $< 10^{-5}$ bis 10^{-1} sec betragen.

1. Blitzlichtphotometrie

Diese von *Porter und Norrish* [39] für anorganische Reaktionen entwickelte Methode wurde 1955 zur Untersuchung der Photosynthese eingeführt [31]. Die speziell für diese Arbeiten entwickelten hochempfindlichen Apparaturen erfassen Vorgänge von 10^{-5} bis 10 sec Dauer. In 10^{-5} sec können Transmissionsänderungen von 0,1 % registriert werden. Bei langsameren Vorgängen ist die Empfindlichkeit entsprechend größer (z.B. Transmissionsänderungen von 0,01 % in 10^{-3} sec). Die Empfindlichkeit der Messungen steigt mit der Intensität des Meßlichtes. Die Intensität muß aber so begrenzt werden, daß die vom Meßlicht verursachte photochemische Reaktion zu vernachlässigen ist. Je nach der Dauer der zu registrierenden Vorgänge (zwischen 10^{-1} und 10^{-5} sec) wurden Intensitäten zwischen ca. 4 und 200 $\text{erg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ verwendet. Die optische Bandbreite des Meßlichts betrug 3 m μ (Gitter, Prisma) oder 10 m μ (Interferenzfilter).

2. Periodische Blitzlichtphotometrie

Zur Erfassung schneller chemischer Reaktionen wurde 1960 das Verfahren der periodischen Relaxation vorgeschlagen und entwickelt [32]. Ein derartiges Meßverfahren ist die periodische Blitzlichtphotometrie [32, 40], mit der sich Vorgänge zwischen 10^{-6} und 1 sec Dauer analysieren lassen. Die Empfindlichkeit ist mehr als 100-mal größer als die der Blitzlichtphotometrie: in 10^{-6} sec können Transmissionsänderungen von 10^{-3} % erfaßt werden. Das zeitliche Auflösungsvermögen dieses Verfahrens hängt nur von der Blitzdauer ab.

Während bei der Blitzlichtphotometrie nach einem Blitz der gesamte anschließende Verlauf der Absorptionsänderung re-

gistriert wird, mißt man beim periodischen Verfahren nur eine Absorptionsänderung zu einem bestimmten Zeitpunkt (zwischen t und $t + \Delta t$). Durch die periodische Anregung kann diese Messung viele Male wiederholt werden. Da die Meßgenauigkeit mit der Wurzel aus der Zahl der Messungen steigt, kann man auf diese Weise die Absorptionsänderung zu einem bestimmten Zeitpunkt sehr genau ermitteln. Danach wird die Absorptionsänderung zu einem anderen Zeitpunkt ermittelt und so fort, bis der gesamte zeitliche Verlauf der Absorptionsänderung abgetastet ist. Alle Operationen werden elektronisch und automatisch bewerkstelligt.

3. Blitzlichtmanometrie

Mit der Blitzlichtmanometrie, die 1932 von *Emerson et al.* [16] eingeführt wurde, kann man Teilreaktionen der Photosynthese indirekt abtasten. Dazu mißt man die pro Blitz gebildete Sauerstoffmenge manometrisch in Abhängigkeit von der Blitzfrequenz. Wir haben diese Methode unter anderen Versuchsbedingungen erneut angewendet [41], um Aussagen über die Kinetik der Wasserspaltung zu gewinnen (siehe Abschnitt X). Der Meßbereich erstreckt sich auf Vorgänge zwischen 10^{-4} und 1 sec Dauer.

Die Leistungsfähigkeit der Blitzlichtmethoden im Verhältnis zu anderen Meßverfahren ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

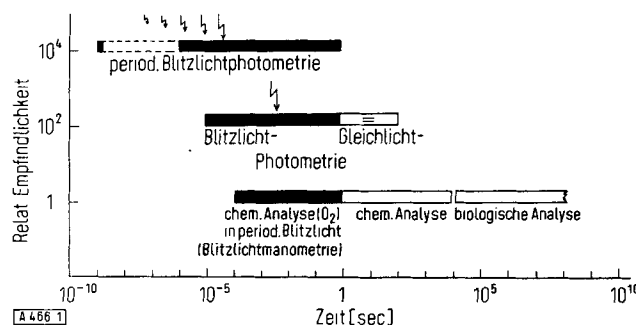


Abb. 1. Empfindlichkeit und zeitliches Auflösungsvermögen verschiedener zur Untersuchung der Photosynthese verwendeter Methoden.

III. Absorptionsänderungen bei der Photosynthese in grünen Pflanzenzellen

Duysens hat mit einer statischen Methode die Beteiligung eines Cytochroms an der Photosynthese in Rotalgen nachgewiesen. In grünen Zellen hat er Absorptionsänderungen um 420, 475 und 520 m μ beobachtet, die jedoch nicht identifiziert wurden [42]. *Kok* [43] entdeckte an verschiedenen Pflanzenzellen sowie an Chloroplasten Absorptionsänderungen um 700 m μ , die durch die Oxydation eines Pigmentes P 700 verursacht werden.

Wir haben mit Blitzlichtmethoden an normalen grünen Zellen (*Chlorella*) und an voll aktiven Chloroplasten (Spinat) verschiedene kurzdauernde Absorptionsänderungen – alle kürzer als ca. 10^{-1} sec bei 20 °C – zwischen 200 und 800 m μ beobachtet. Durch Variation der äußeren

[39] R. G. W. Norrish u. G. Porter, Nature (London) 164, 658 (1949).

[40] H. Rüppel, V. Bültmann u. H. T. Witt, Ber. Bunsenges. physikal. Chem. 68, 752 (1964).

[41] V. Bültmann, H. Rüppel u. H. T. Witt, Nature (London) 204, 646 (1964).

[42] N. M. Duysens, Nature (London) 173, 692 (1954).

[43] B. Kok u. W. Gott, Plant Physiol. 35, 802 (1960); B. Kok, Acta bot. neerl. 6, 316 (1957).

ren Parameter und durch Eingriffe in das Geschehen in der Zelle konnten wir verschiedene Typen von Absorptionsänderungen separieren und die damit verknüpften Reaktionen analysieren:

1. Bildung des Derivates eines speziellen Chlorophyll-a-Moleküls, Chl-a_I-430-520 (Abb. 2b) [44, 45].
2. Oxydation eines speziellen Chlorophyll-a-Moleküls, Chl-a_I-430-703, ermittelt aus Absorptionsänderungen um 430 m μ , die mit denen des Pigmentes P 700 um 703 m μ exakt gekoppelt sind (Abb. 2c) [46–48].
3. Reaktion eines speziellen Chlorophyll-b-Moleküls, Chl-b-478-513-648 (Abb. 2d) [49–52].
4. Oxydation eines Cytochrom-f, Cyt-f-407-424-555 (Abb. 2f) [46, 53–55].
5. Reduktion eines Cytochrom-b⁺, Cyt-b-412-435-563 (Abb. 2e) [56].
6. Reduktion von Plastochinon, Q-254 (Abb. 2g) [57–61].
7. Reduktion eines Stoffes Z, indirekt ermittelt aus der Kinetik der Absorptionsänderungen von Chl-a_I [48, 62].
8. Oxydation eines Stoffes Y, indirekt ermittelt aus der Kinetik der Absorptionsänderungen von Chl-b und aus der O₂-Ausbeute im periodischen Blitzlicht [41].
9. Reaktion eines speziellen Chlorophyll-a-Moleküls, Chl-a_{II}, ermittelt aus den Aktionsspektren der Absorptionsänderungen [63]. Dieses Ergebnis bestätigt Mes-

sungen von Govindjee et al. [23], die aus dem Emerson-effekt auf die Existenz eines Chlorophyll-a_{II}-Moleküls geschlossen hatten.

10. Bildung des π - π^* -Triplett-Zustandes in der Masse der Chlorophyll-a- und Chlorophyll-b-Moleküle, Chl-a₀-435-675 bzw. Chl-b₀-475-650, bei Veränderung der Chloroplastenstruktur bzw. bei deaktivierter Photosynthese (Abb. 2a) [64].

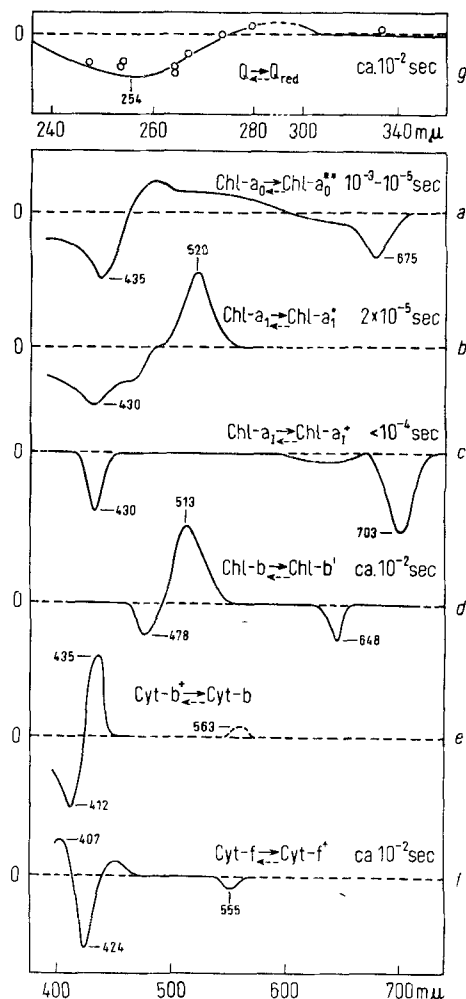


Abb 2. Differenzspektren, die an grünen Zellen (*Chlorella*-Zellen oder Spinat-Chloroplasten) bei Einstrahlung von Blitzlicht auftreten [47]. Sie wurden aus einem komplexen Gemisch von Absorptionsänderungen separiert. Die Größenordnung der Absorptionsänderungen beträgt ca. 0,1 %. Die Zahlen bedeuten die Maxima der Absorptionsänderungen, die Zeiten die Dauer der durch gestrichelte Pfeile angedeuteten Rückreaktionen. Die Technik der Separierung und die Bedeutung der Symbole werden im Text beschrieben.

Ordinate: Absorptionsänderung.
Abszisse: Wellenlänge.

Unter anomalen Umständen treten folgende Cytochrom-Reaktionen auf: *Chance* et al. [65] haben an chlorophyll- und carotinarmen Mutanten langsame (≥ 1 sec) Cytochrom-f-Absorptionsänderungen unter aeroben Bedingungen beobachtet und Cytochrom-b-Absorptionsänderungen unter anaeroben Bedingungen. *Olson* et al. [66] fanden an Fragmenten von *Euglena*-Chloroplasten, die kein Cytochrom-f

- [44] R. Moraw u. H. T. Witt, Z. physikal. Chem., N.F. 29, 1 (1961).
- [45] G. Zieger, A. Müller u. H. T. Witt, Z. physikal. Chem., N.F. 29, 13 (1961).
- [46] H. T. Witt, A. Müller u. B. Rumberg, Nature (London) 192, 967 (1961).
- [47] B. Rumberg u. H. T. Witt, Z. Naturforsch. 19b, 693 (1964).
- [48] B. Rumberg, Z. Naturforsch. 19b, 707 (1964).
- [49] H. T. Witt u. R. Moraw, Z. physikal. Chem., N.F. 20, 253 (1959).
- [50] H. T. Witt u. R. Moraw, Z. physikal. Chem. N.F. 20, 283 (1959).
- [51] H. T. Witt u. A. Müller, Z. physikal. Chem., N.F. 21, 1 (1959).
- [52] B. Rumberg, Nature (London) 204, 860 (1964).
- [53] H. T. Witt, A. Müller u. B. Rumberg, Nature (London) 191, 194 (1961).
- [54] A. Müller, B. Rumberg u. H. T. Witt, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B, 157, 313 (1963).
- [55] H. T. Witt, A. Müller u. B. Rumberg: Colloques Internationaux No. 119 „La Photosynthèse“. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris 1963, S. 43.
- [56] B. Rumberg, Biochim. biophysica Acta 102, 354 (1965); Recent Progress in Photobiology. Backwell Scientific Publications, Oxford 1965, S. 269.
- [57] M. Klingenberg, A. Müller, P. Schmidt-Mende u. H. T. Witt, Nature (London) 194, 379 (1962).
- [58] J. Weikard, A. Müller u. H. T. Witt, Z. Naturforsch. 18b, 139 (1963).
- [59] B. Rumberg, P. Schmidt-Mende, J. Weikard u. H. T. Witt in: Photosynthetic Mechanisms of Green Plants. Publ. 1145, Nat. Acad. Sci. – Nat. Res. Council, Washington 1963, S. 18.
- [60] B. Rumberg, P. Schmidt-Mende u. H. T. Witt, Nature (London) 201, 466 (1964).
- [61] B. Rumberg, P. Schmidt-Mende, B. Skerra, J. Weikard u. H. T. Witt, Z. Naturforsch., im Druck.
- [62] B. Rumberg, A. Müller u. H. T. Witt, Nature (London) 194, 854 (1962).
- [63] A. Müller, D. C. Fork u. H. T. Witt, Z. Naturforsch. 18b, 142 (1963).

- [64] R. Moraw u. H. T. Witt, Z. physikal. Chem., N.F. 29, 25 (1961).
- [65] B. Chance u. R. Sager, Plant Physiol. 32, 548 (1957).
- [66] J. M. Olson u. R. M. Smillie: Photosynthetic Mechanisms of Green Plants. Publ. 1145, Nat. Acad. Sci. – Nat. Res. Council, Washington 1963, S. 56.

enthielten, langsame (> 10 sec) durch Cytochrom-b erzeugte Absorptionsänderungen. Bonner und Hill [67] haben solche Änderungen nur an etiolierten, jedoch nicht an normalen grünen Zellen nachweisen können. Von Lundegard [68] gemessene Änderungen der Cytochrom-Absorption verlaufen so langsam (> 10 sec), daß sie mit den Primärvorgängen nicht in Zusammenhang stehen können [65].

Kouchkovski et al. [69] haben Absorptionsänderungen um $590\text{ m}\mu$ beobachtet, die durch eine Reaktion von Plastocyanin verursacht werden. Wie weit auch diese verhältnismäßig langsam verlaufende Reaktion (> 1 sec) mit den Elementarvorgängen in Zusammenhang steht, ist noch nicht ermittelt worden.

IV. Der separierte Reaktionscyclus I

1. Separierung des Differenzspektrums von Chlorophyll- a_1 -430-703

Der Triplett-Zustand von Chl- a_0 und Chl- b_0 (Abb. 2a) tritt unter „normalen“ Bedingungen [*] nicht auf [64]. Das vom Chlorophyll- a_1 gebildete Derivat (Abb. 2b) besitzt nur eine Lebensdauer von 2×10^{-5} sec [44]. Die Absorptionsänderungen des Plastochinons Q-254 (Abb. 2g) treten nur im ultravioletten Spektralbereich auf [57]. Beschränkt man sich auf den sichtbaren Bereich (400 bis $800\text{ m}\mu$) und läßt man die sehr schnellen Absorptionsänderungen von Chl- a_1 unberücksichtigt, so beobachtet man unter normalen Bedingungen ein zwar vereinfachtes, aber weiterhin komplexes Gemisch von Absorptionsänderungen (Abb. 3a). In diesem Spektrum können vier Teilreaktionen nachgewiesen werden, über die im folgenden berichtet wird.

Die Absorptionsänderungen um $700\text{ m}\mu$ in Abbildung 3a haben Kok et al. [70–72] entdeckt und der Oxydation eines Pigmentes P 700 zugeschrieben (Redoxpotential $E_0 = 0,43$ Volt). Auf Grund von Messungen an acetone-extrahierten inaktiven Chloroplasten wurde vermutet, daß das Pigment 700 ein Chlorophyll-a ist. Ein direkter Beweis wurde nicht erbracht. Zur Identifizierung von P 700 haben wir die durch Absorptionsänderung bei $703\text{ m}\mu$ gekennzeichnete Reaktion separiert. Dies gelang auf verschiedenen Wegen [47]: a) Isolierte Chloroplasten sind nach einigen Stunden photosynthetisch inaktiv. Vernon und Zaugg [73] haben gezeigt, daß diese Inaktivierung nur die Wasserspaltung betrifft. Setzt man gealterten Chloroplasten Elektronendonatoren zu, so reduzieren sie bei Belichtung TPN. An diesem System (Zusatz von 2,6-Dichlorphenol-indophenol oder von

N-Methylphenazonium-methylsulfat mit überschüssigem Ascorbat) beobachteten wir ein vereinfachtes Differenzspektrum mit Änderungen um 430 und $703\text{ m}\mu$ (Abb. 3b). Ähnliche Differenzspektren wurden beobachtet b) bei Auflösung der Chloroplasten in fein verteilte

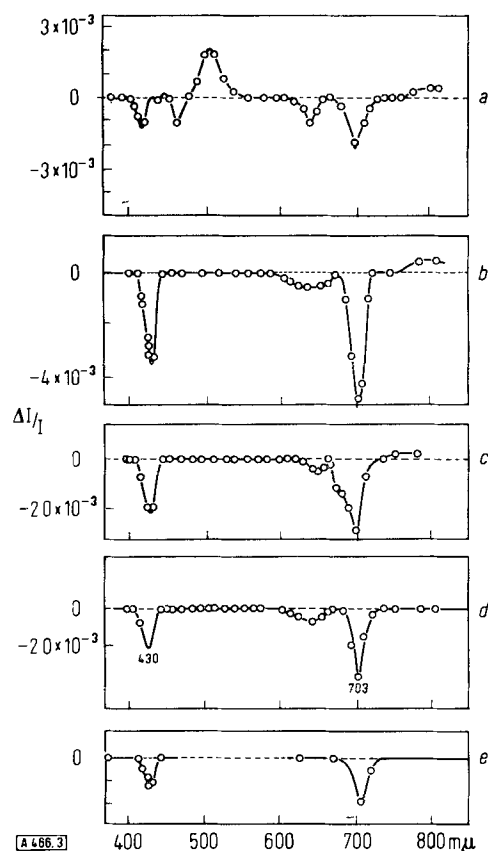


Abb. 3. An belichteten Spinat-Chloroplasten gemessene Differenzspektren [47].

- (a) Normale Bedingungen, Zusatz von Benzylviologen als Elektronenakzeptor.
- (b) Nach Alterung und Zusatz von N-Methylphenazonium-methylsulfat + Ascorbat.
- (c) Nach Behandlung mit Digitonin und Zusatz von N-Methylphenazonium-methylsulfat + Ascorbat.
- (d) Nach Extraktion mit Petroläther.
- (e) Bei -150°C und Zusatz von N-Methylphenazonium-methylsulfat + Ascorbat.

Die Kurven (b)–(e) stellen das separierte Differenzspektrum bei der Oxydation von Chlorophyll- a_1 -430-703 dar.

Ordinate: Absorptionsänderung $\Delta I/I$.

Abzisse: Wellenlänge [$\text{m}\mu$].

Partikel mit Hilfe oberflächenaktiver Stoffe (Digitonin) (Abb. 3c), c) an Chloroplasten, aus denen mit Petroläther Plastochinon extrahiert worden war (Abb. 3d), d) an Chloroplasten bei -150°C (Abb. 3e), e) an Chloroplasten nach Blockierung der Wasserspaltung durch Zusatz von N-p-Chlorphenyl-N'-dimethylharnstoff [47] und f) an normalen Chloroplasten bei zusätzlicher Dauerbeleuchtung mit Licht der Wellenlänge 700 – $730\text{ m}\mu$ [47,48].

Wieweit das vereinfachte Differenzspektrum durch die Reaktion eines Stoffes verursacht wird, läßt sich ermitteln, indem man die Größe und den zeitlichen Verlauf der Änderungen bei 430 und $703\text{ m}\mu$ unter verschiedenen Bedingungen vergleicht.

[67] W. Bonner u. R. Hill, [66], S. 82.

[68] H. Lundegardh, *Physiol. Plantarum* 7, 375 (1954).

[69] Y. de Kouchkovski u. D. C. Fork, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 52, 232 (1964).

[*] Normale Bedingungen: *Chlorella*-Zellen oder Spinat-Chloroplasten mit Elektronenakzeptoren; O_2 -Produktion: 1000 – $3000\text{ mm}^3\text{ O}_2$ pro mg Chlorophyll und Std. Anregung mit blauem (380 – $480\text{ m}\mu$) oder rotem (620 – $720\text{ m}\mu$) Licht.

[70] a) B. Kok, *Plant Physiol.* 34, 184 (1959); b) B. Kok u. W. Gott, *ibid.* 35, 802 (1960); c) B. Kok, B. Cooper u. L. Yang: *Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria*. The University of Tokyo Press 1963, S. 373.

[71] B. Kok, *Biochim. biophysica Acta* 48, 527 (1961).

[72] H. Beinert, B. Kok u. G. Hoch, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 7, 109 (1962); B. Kok u. H. Beinert, *ibid.* 9, 349 (1962).

[73] L. P. Vernon u. W. S. Zaugg, *J. biol. Chemistry* 235, 2728 (1960).

2. Zeitlicher Verlauf der Absorptionsänderungen

Bei Einstrahlung eines Blitzes von 3×10^{-6} sec Dauer in eine normale Chloroplasten-Suspension nimmt die Absorption bei 703 m μ in $< 10^{-5}$ sec ab (Abb. 4). Sie geht anschließend bei 20 °C in 10^{-2} sec auf den Ausgangswert

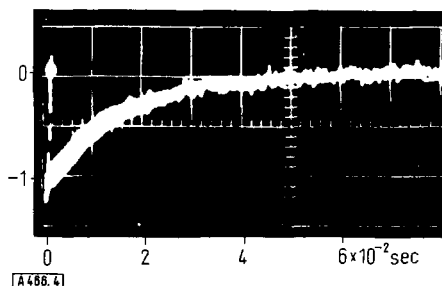


Abb. 4. Zeitlicher Verlauf der Absorptionsänderung von Chlorophyll- a_1 bei 703 m μ in Spinat-Chloroplasten. Zur Zeit $t = 0$ wurde Blitzlicht von 3×10^{-6} sec Dauer eingestrahlt [47]. 20 °C.

Ordinate: Relative Absorptionsänderung.
Abszisse: Zeit [sec].

zurück [47,55]. Diese Rückreaktionszeit beobachtet man nur, wenn zusätzlich eine langwellige Dauerbeleuchtung (700–730 m μ) vorhanden ist. Als solche kann bereits das Meßlicht dienen. Bei sehr schwacher Zusatzbeleuchtung (Meßlichtintensität $\rightarrow 0$) erreicht die Absorption ihren Ausgangswert schon nach $< 10^{-4}$ sec [52] (vgl. Abschnitt XII).

3. Zuordnung der Absorptionsänderungen zu einer Chlorophyll- a_1 -Reaktion

Größe und Halbwertszeit der Absorptionsänderungen bei 430 und 703 m μ ändern sich bei einer Variation der äußeren Bedingungen in gleicher Weise [47]. Abbildung 5 zeigt z.B. die Halbwertszeit für beide Absorptionsänderungen in Abhängigkeit vom pH-Wert. Daraus folgt, daß beide Absorptionsänderungen durch die Reaktion eines Stoffes zustandekommen. Da Chlorophyll-a in vivo Absorptionsmaxima um 430 und 700 m μ besitzt, müssen die in Abbildung 3b–e wiedergegebenen Differenzspektren einem photochemisch aktiven Chlorophyll-a, Chl- a_1 -430-703, entsprechen [46,47]. Die Abnahme der Absorption bei Einstrahlung eines Blitzes

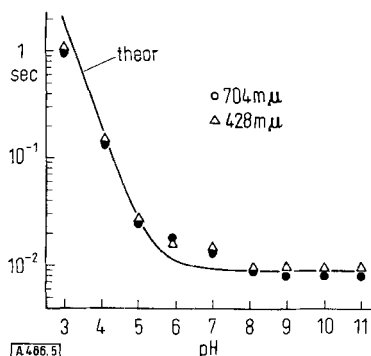


Abb. 5. Halbwertszeit der Absorptionsänderungen von Chlorophyll- a_1 bei 428 und 704 m μ in Spinat-Chloroplasten in Abhängigkeit vom pH-Wert [47]. Zusatz von N-Methylphenazonium-methylsulfat + Ascorbat als Elektronendonator.

Ordinate: Halbwertszeit [sec].
Abszisse: pH-Wert.

bedeutet demnach die Bildung eines Derivates Chl- a_1' , die anschließende Zunahme der Absorption entsteht durch die Rückreaktion in den Ausgangszustand Chl- a_1 .

4. Oxydation von Chlorophyll- a_1

Setzt man gealterten Chloroplasten N-Methylphenazonium-methylsulfat + überschüssiges Ascorbat zu, so beobachtet man eine starke Abhängigkeit der Rückreaktion von der Konzentration des Phenazonium-Salzes (Abb. 6) [47,74].

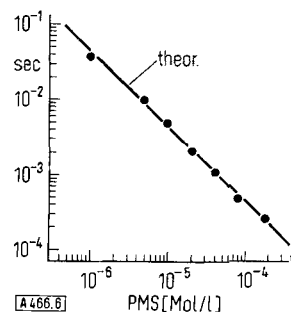
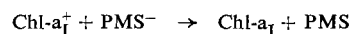


Abb. 6. Halbwertszeit der Absorptionsänderungen von Chlorophyll- a_1 bei 705 m μ in Spinat-Chloroplasten in Abhängigkeit von der Konzentration an N-Methylphenazonium-methylsulfat (PMS) + Ascorbat [47,74].

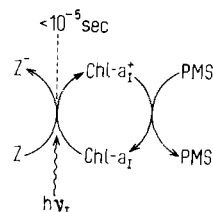
Ordinate: Halbwertszeit.
Abszisse: Konzentration.

Die Analyse ergibt eine Rückreaktion erster Ordnung, die sich als eine Reaktion des Chlorophyll- a_1' -Derivates mit reduziertem Phenazonium-Salz deuten läßt, d.h. das im Licht gebildete Derivat Chl- a_1' muß ein oxydiertes Produkt sein. Aus der pH-Abhängigkeit des Redoxpotentials (Abb. 8) folgt, daß Chl- a_1' in Form eines Kations Chl- a_1^+ vorliegt (vgl. Abschnitt V,7). Aus der pH-Abhängigkeit der Halbwertszeit der Rückreaktion (Abb. 5) ergibt sich, daß das reduzierte N-Methylphenazonium-methylsulfat als PMS^- mit Chl- a_1^+ reagiert [47]:



Die Geschwindigkeitskonstante für diese Reaktion beträgt $k = 1,5 \cdot 10^7 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$. Die Temperaturabhängigkeit ergibt eine Aktivierungsenergie von $E_A = 3,8 \text{ kcal/mol}$ [47].

Der an der Oxydation von Chl- a_1 zu Chl- a_1^+ beteiligte Elektronenakzeptor ist unbekannt. Wir nennen ihn Z. Da bei Einstrahlung eines Lichtblitzes ($h\nu_i$) die Absorption des Chl- a_1 in $< 10^{-5}$ sec abnimmt, muß der Elektronenübergang von Chl- a_1 nach Z in dieser Zeitspanne stattfinden. Zusammengefaßt ergeben diese Befunde das Schema 1.



Schema 1. Oxydation von Chlorophyll- a_1 bei Einstrahlung eines Lichtblitzes $h\nu_i$ und Rückreduktion durch reduziertes N-Methylphenazonium-methylsulfat.

[74] H. T. Witt, A. Müller u. B. Rumberg, Nature (London) 197, 987 (1963).

5. Oxydation von Chlorophyll- a_1 als Primärprozeß

Chlorophyll- a_1 wird auch bei tiefen Temperaturen oxydiert, doch ist unter diesen Bedingungen die Rückreduktion verhindert. Das folgt aus der Irreversibilität der Absorptionsänderung bei -150°C (Abb. 7).

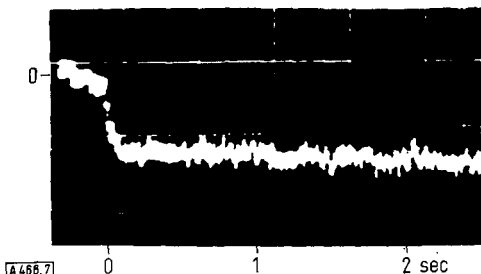


Abb. 7. Zeitlicher Verlauf der Absorptionsänderung von Chlorophyll- a_1 bei $426\text{ m}\mu$ in Spinat-Chloroplasten bei -150°C [47, 75]. Zur Zeit $t = 0$ wurde $0,2\text{ sec}$ belichtet.
Ordinate: Relative Absorptionsänderung.
Abszisse: Zeit [sec].

Das Differenzspektrum der irreversiblen Absorptionsänderung bei -150°C (Abb. 3e) gleicht den Differenzspektren der reversiblen Absorptionsänderungen bei 20°C (Abb. 3b–d). Die Tatsache, daß die Oxydation von Chlorophyll- a_1 bei -150°C nicht behindert ist, zeigt, daß es sich hier um einen Primärakt der Photosynthese handeln muß [46, 47].

6. Redoxpotential von Chlorophyll- a_1

Die Oxydation von Chl- a_1 in vivo kann nicht nur photochemisch, sondern auch chemisch mit $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ bewirkt werden. Bei Zusatz von $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ verschiebt sich das Verhältnis $\text{Chl-}a_1^+/\text{Chl-}a_1$ mit zunehmender $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -Konzentration zugunsten von $\text{Chl-}a_1^+$. Die Folge davon ist eine Abnahme der durch Lichteinstrahlung bewirkten Absorp-

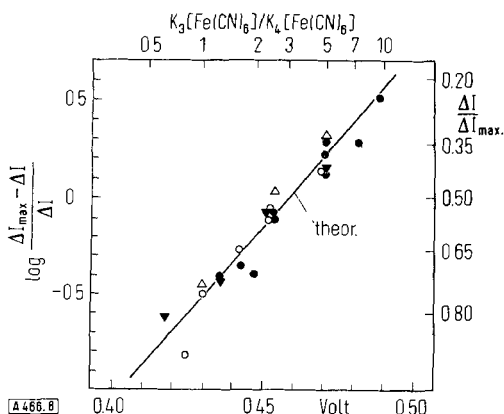


Abb. 8. Absorptionsänderungen von Chlorophyll- a_1 bei $705\text{ m}\mu$ in Spinat-Chloroplasten in Abhängigkeit vom Redoxpotential eines Gemisches von $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ und $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ [48, 59].
○ pH = 6,0
Δ pH = 6,7
□ pH = 7,2
▼ pH = 7,8

Ordinaten: Relative Absorptionsänderung.
Abszissen: oben: Konzentrationsverhältnis.
unten: Redoxpotential [Volt].

[75] A. Müller, Dissertation, Universität Marburg, 1962.

tionsänderung, weil dem eingestrahnten Licht weniger Chl- a_1 zur Verfügung steht. Aus der Größe der Absorptionsänderung in Abhängigkeit vom Verhältnis $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Abb. 8) folgt als Redoxpotential [46, 48, 59]:

$$E_{\text{Chl-}a_1^+/\text{Chl-}a_1} = 0,46 \pm 0,01 \text{ Volt.}$$

Die pH-Unabhängigkeit des Redoxpotentials zeigt einen reinen Elektronenübergang an. Ähnlich hatte zuerst Kok [71] das Redoxpotential von P 700+/P 700 an acetone-extrahierten Chloroplasten zu $0,43\text{ Volt}$ bestimmt.

7. Der natürliche Elektronendonator für die Rückreduktion von Chl- a_1^+

In der separierten Chl- a_1 -Reaktion (Schema 1) diene als künstlicher Elektronendonator reduziertes N-Methylphenazonium-methylsulfat (PMS^-). Da die am separierten System gefundenen Absorptionsänderungen auch an normalen Chloroplasten auftreten [47, 48], muß hier ein natürlicher, zunächst unbekannter Elektronendonator das $\text{Chl-}a_1^+$ reduzieren. Aus dem zeitlichen Verlauf der Absorptionsänderungen ergibt sich dafür bei 20°C eine Zeit von ca. 10^{-2} sec (Abb. 4).

Separiert man die Chl- a_1 -Reaktion vom natürlichen Elektronendonator (durch Alterung der Chloroplasten, Extraktion mit Petroläther, oder Zusatz von Digitonin oder N-p-Chlorphenyl-N'-dimethylharnstoff), so sollte ohne Zusatz eines künstlichen Elektronendonators keine Reduktion des $\text{Chl-}a_1^+$ stattfinden. Dies ist jedoch nicht der Fall (Abb. 9b). Vielmehr treten 10^{-2} sec

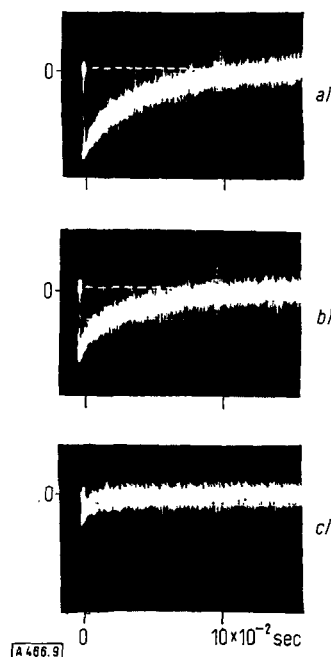


Abb. 9. Zeitlicher Verlauf der Absorptionsänderung von Chlorophyll- a_1 bei $705\text{ m}\mu$ in Spinat-Chloroplasten (a) ohne und (b) mit Zusatz von N-p-Chlorphenyl-N'-dimethylharnstoff ($6 \times 10^{-5}\text{ M}$) und (c) mit N-p-Chlorphenyl-N'-dimethylharnstoff ($6 \times 10^{-5}\text{ M}$) plus Benzylviologen (10^{-4} M). Zur Zeit $t = 0$ wurde Blitzlicht von $2 \times 10^{-4}\text{ sec}$ Dauer eingestrahlt [48].

Ordinate: Relative Absorptionsänderungen.
Abszisse: Zeit [sec].

dauernde Absorptionsänderungen auf, offenbar weil das zunächst vom natürlichen Elektronenakzeptor Z aufgenommene Elektron in einer Rückreaktion von ca. 10^{-2} sec Dauer das Chl- a_1^+ wieder reduzieren kann [48, 62, 74] (oberer gekrümmter Pfeil im Schema 2).

8. Künstliche Elektronenakzeptoren für Z^- und Redoxpotential von Z

Durch Abfangen des von Z übernommenen Elektrons mit künstlichen Elektronenakzeptoren kann diese Reduktion von Chl- a_1^+ verhindert werden. So verschwindet die mit N-p-Chlorphenyl-N'-dimethylharnstoff vom natürlichen Elektronendonator separierte Chl- a_1 -Reaktion, wenn man dem System z.B. Benzylviologen als Elektronenakzeptor zusetzt (Abb. 9c). Auf diese Weise und besonders mit der im Abschnitt XII,2 beschriebenen Methode kann man feststellen, welche Stoffe an Z^- angreifen. Sie sind in Tabelle 1 zusammengestellt und werden als „künstliche Elektronenakzeptoren I“ bezeichnet (vgl. Schema 2) [48, 62, 74].

Tabelle 1. Künstliche Elektronenakzeptoren I, die Elektronen von Z^- übernehmen können [48, 74].

	Redoxpotential [Volt] (pH = 7)
$K_3[Fe(CN)_6]$	+ 0,43
p-Benzochinon	+ 0,28
m-Kresolindophenol	+ 0,21
Vitamin K_3	≈ 0
Indigosulfonat	- 0,05 bis - 0,16
Riboflavin	- 0,21
Flavinmononucleotid	- 0,22
Safranin T	- 0,29
Neutralrot	- 0,33
Benzylviologen	- 0,36
Methylviologen	- 0,44

Aus Tabelle 1 folgt für das Redoxpotential von Z ein Wert von $< - 0,44$ V [48, 62].

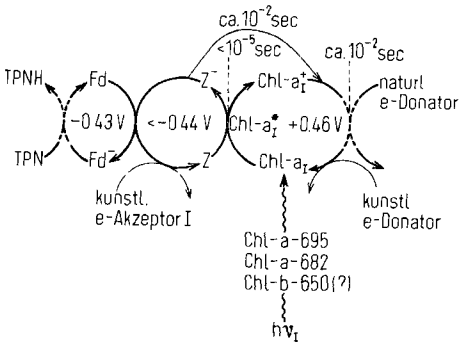
9. TPN und Ferredoxin als natürliche Elektronenakzeptoren für Z^-

Mit der im Abschnitt XII,2 beschriebenen Methode wurde festgestellt, daß von den in Pflanzenzellen vorhandenen natürlichen Elektronenakzeptoren TPN allein nicht, wohl aber TPN in Gemeinschaft mit TPN-Reduk-

tase als natürlicher Elektronenakzeptor für Z^- dienen kann [74]. TPN-Reduktase enthält also ein Redoxsystem, welches zwischen Z und TPN fungiert (Schema 2) [74]. Tagawa et al. [13c] hatten vorher gezeigt, daß TPN-Reduktase [13a, b] mit Ferredoxin identisch ist und daß außerdem zwischen Ferredoxin und TPN ein Flavoprotein als Überträger fungiert [14].

10. Schema des Reaktionscyclus I

Faßt man die bisher beschriebenen Beobachtungen zusammen, so erhält man für den Reaktionscyclus I das im Schema 2 wiedergegebene Bild.



Schema 2. Elektronenfluß im Reaktionscyclus I [48, 54, 55, 62, 74]. Als künstliche Elektronendonatoren können PMS⁻ oder DPIP + Ascorbat wirken.

Primär wird Chl- a_1 -430-703 durch Lichtabsorption ($h\nu_1$) in den angeregten Zustand Chl- a_1^* übergeführt. In $< 10^{-5}$ sec wird ein Elektron von Chl- a_1^* auf Z übertragen. Das Redoxpotential von Chl- a_1^+ muß kleiner als $- 0,44$ Volt sein, da das Redoxpotential von $Z/Z^- < - 0,44$ Volt ist. Das Redoxpotential von Chl- $a_1^+/Chl-a_1$ beträgt $+ 0,46$ Volt. Von Z^- wird das Elektron über Ferredoxin auf TPN übertragen. Steht in isolierten Chloroplasten kein natürlicher Elektronenakzeptor (TPN) zur Verfügung, so kann das Elektron in ca. 10^{-2} sec von Z^- an Chl- a_1^+ zurückgegeben oder von künstlichen Elektronenakzeptoren I (Tabelle 1) aufgenommen werden. Normalerweise reduziert ein (unbekannter) zelleigener Elektronendonator Chl- a_1^+ in ca. 10^{-2} sec wieder zum Chl- a_1 . Separiert man den Cyclus I vom zelleigenen Elektronendonator (Alterung, Extraktion mit Petroläther, Behandlung mit Digitonin, Zugabe von N-p-Chlorphenyl-N'-dimethylharnstoff oder tiefe Temperaturen), so kann ein künstlicher Elektronendonator (2,6-Dichlorphenol-indophenol oder N-Methylphenazonium-methylsulfat + überschüssiges Ascorbat) seine Funktion übernehmen [47, 54, 55, 59, 74].

Die Eigenschaften des separierten Reaktionscyclus I sind in Tabelle 2 und Abbildung 19 (links) zusammengestellt [48, 74, 82].

Tabelle 2. Eigenschaften der separierten Reaktionscyclus I und II [48, 61, 74, 82].

Eigenschaften	Reaktionscyclus I	Reaktionscyclus II
Absorptionsänderung	Chl-a: 430, 703 m μ	(Chl-b): 478, 513, 648 m μ Q: 254 m μ
Konzentration	$[Chl-a_1] = 10^{-3} \times [Chlorophyll]$	$[(Chl-b)] = 10^{-3} \times [Chlorophyll]$
Extinktion	$\epsilon(Chl-a_1(703)) = 10^5 \text{ l} \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	$\epsilon(Chl-b(478)) = 10^5 \text{ l} \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
Redoxpotential (Donator)	$+ 0,46$ Volt Chl- $a_1^+/Chl-a_1$	$\geq + 0,81$ Volt Y^+/Y
Redoxpotential (Akzeptor)	$< - 0,44$ Volt Z/Z^-	ca. 0 Volt (Chl-b)/(Chl-b) ⁻
versorgt durch Energieleitung über	Chl-b-650?, Chl-a-682, Chl-a-695	Chl-b-650, Chl-a-674
Anregungsbereich	$\lambda < 730$ m μ	$\lambda < 700$ m μ
Geschwindigkeitskonstante	$k = 1,5 \times 10^7 \text{ l} \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ Chl- a_1^+ mit PMS ⁻	$k = 1,6 \times 10^6 \text{ l} \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ (Chl-b) ⁻ mit DPIP bei pH = 6,5
Aktivierungsenergie	$E_A = 3,8$ kcal/Mol Chl- a_1^+ mit PMS ⁻	$E_A = 7,4$ kcal/Mol(Chl-b)-mit DPIP
pH-Bereich	3-11	5-8
Inaktivierungstemperatur (5 min)	65 °C	40 °C
alterungsempfindlich	nein	ja
empfindlich gegen N-p-Chlorphenyl-N'-dimethylharnstoff	nein	ja

V. Der separierte Reaktionscyclus II

1. Separierung des Differenzspektrums von Chlorophyll-b-478-513-648

Bei der Separierung des Cyclus I treten die Absorptionsänderungen bei 478 und 513 m μ nicht mehr in Erscheinung (Abb. 3). Durch physikalische oder chemische Eingriffe ins Zellgeschehen ist es auch möglich, den Cyclus I zu deaktivieren und den mit Absorptionsänderungen bei 478 und 513 m μ verbundenen Cyclus zu separieren.

a) Physikalische Separierung

Wird Dauerlicht der Wellenlänge $\lambda > 700$ m μ (als solches wirkt bereits das Meßlicht) vom Zellsystem weitgehend abgeschirmt, so ergibt sich ein Differenzspektrum mit Maxima bei 478, 513 und 648 m μ (Abb. 10b) [52]. Die Absorptionsänderung von Chl-a_I um 700 m μ (Abb. 10a) tritt praktisch nicht mehr auf. (Über die Ursache der Separierung siehe Abschnitt XII,1.)

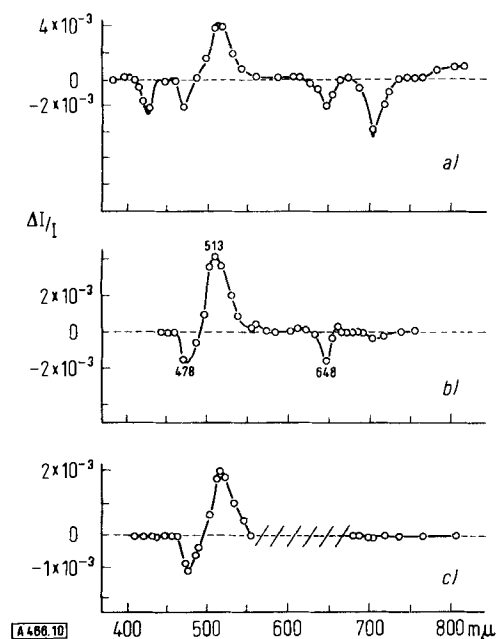


Abb. 10. An belichteten *Chlorella*-Zellen (b) und Spinat-Chloroplasten (a, c) gemessene Differenzspektren.

a) Normale Bedingungen, Zusatz von Benzylviologen als Elektronenakzeptor. Ohne Abschirmung von Dauerlicht der Wellenlänge $\lambda > 700$ m μ .

b) Bei Abschirmung von Dauerlicht der Wellenlänge $\lambda > 700$ m μ [52].

c) Bei Zusatz von Dichlorphenol-indophenol + $K_3[Fe(CN)_6]$ [59, 61]. Die Kurven (b) und (c) stellen das separierte Differenzspektrum bei der Reaktion von Chlorophyll-b-478-513-648 dar.

Ordinate: Absorptionsänderung $\Delta I/I$.

Abszisse: Wellenlänge [m μ].

b) Chemische Separierung

Ein ähnliches Ergebnis erhält man, wenn man Chloroplasten z.B. Dichlorphenol (mit $K_3[Fe(CN)_6]$ als Redoxpuffer) zusetzt. Ein durch Maxima bei 478

und 513 m μ charakterisiertes Differenzspektrum bleibt erhalten (Abb. 10c) [54, 59, 61]. Die Absorptionsänderung bei 648 m μ (Abb. 10b) kann unter diesen Umständen nicht gemessen werden, da Dichlorphenol-indophenol zwischen 550 und 660 m μ stark absorbiert. (Über die Ursache dieser chemischen Separierung siehe Abschnitt V,10.)

2. Zeitlicher Verlauf der Absorptionsänderungen

Bei Blitzlichteinstrahlung steigt die Absorption bei 515 m μ in $< 10^{-5}$ sec an (Abb. 11). Im Dunkeln bildet sich der Ausgangszustand bei 20 °C in ca. 10^{-2} sec zurück [76–78].

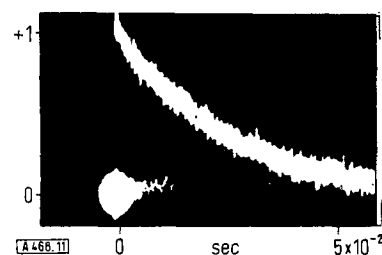


Abb. 11. Zeitlicher Verlauf der Absorptionsänderung von Chlorophyll-b bei 515 m μ in *Chlorella*-Zellen. Zur Zeit $t = 0$ wurde Blitzlicht von 10^{-5} sec Dauer eingestrahlt [49]. 20 °C.

Ordinate: Relative Absorptionsänderung.

Abszisse: Zeit [sec].

3. Zuordnung der Absorptionsänderungen zu einer Chlorophyll-b-Reaktion

Größe und Halbwertszeit der Absorptionsänderungen bei 478, 513 und 648 m μ hängen stark von äußeren Bedingungen ab. Sie zeigen jedoch quantitativ stets das-

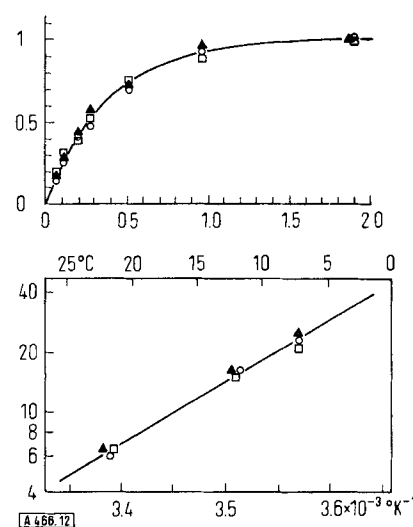


Abb. 12. Absorptionsänderungen von Chlorophyll-b bei 473 (○), 515 (□) und 648 (▲) m μ in *Chlorella* in Abhängigkeit von der Lichtintensität (oben) und der Temperatur (unten) [52].

Ordinaten: oben: relative Absorptionsänderungen.

unten: Halbwertszeit [10^{-3} sec].

Abszissen: oben: Bestrahlungsstärke [10^5 erg·cm $^{-2}$ ·sec $^{-1}$].

unten: Temperatur [°C] und Kehrwert der absoluten Temperatur [°K $^{-1}$].

[76] H. T. Witt, *Naturwissenschaften* 42, 72 (1955).

[77] H. T. Witt, *Z. Elektrochem.* 59, 981 (1955).

[78] H. T. Witt, R. Moraw u. A. Müller, *Z. Elektrochem.* 60 1148 (1956).

selbe Verhalten [49–52]. Daraus folgt, daß sie von einem Stoff verursacht werden. Zwei Beispiele sind in Abb. 12 dargestellt.

Die Abnahme bei der Absorption bei 478 und 648 m μ (Abb. 10) entspricht der Ausbleichung eines Pigmentes, das bei diesen Wellenlängen absorbiert. Banden bei ca. 478 und 648 m μ hat in vivo das Chlorophyll-b. Die Absorptionsänderung ist also der Reaktion eines Chlorophyll-b, des Chl-b-478-513-648, zuzuordnen [52]. bei der ein Derivat entsteht, das bei 513 m μ absorbiert. Das in Abbildung 10b und 10c gezeigte Differenzspektrum kann nur an Pflanzenzellen beobachtet werden, die Chlorophyll-b enthalten (grüne Pflanzenzellen). Blau- und Rotalgen, die kein Chlorophyll-b enthalten, zeigen dieses Spektrum nicht.

4. Die Chlorophyll-b-Reaktion als Indikator-Reaktion

Chlorophyll-b ist nicht unmittelbar am Elektronenfluß der Photosynthese beteiligt. Man kann durch chemische Eingriffe die Absorptionsänderungen von Chl-b nahezu löschen, ohne die Absorptionsänderung von Chlorophyll-a₁ und die Sauerstoffproduktion wesentlich zu beeinträchtigen (Abb. 13) [61, 79], d.h. die Elementarreaktionen der Photosynthese bleiben erhalten. Chlorophyll-b ist also nur ein Indikator für einen am Elektronentransport beteiligten Stoff X. Durch Alkohol wird

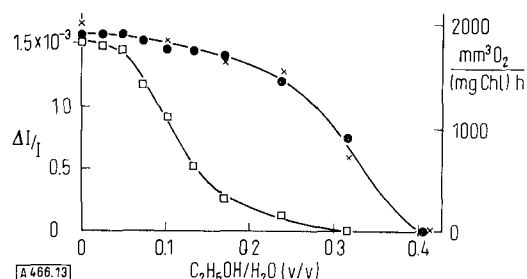


Abb. 13. Sauerstoffproduktion (×) und Absorptionsänderungen von Chlorophyll-a₁ bei 704 m μ (●) und von Chlorophyll-b bei 515 m μ (□) in Spinat-Chloroplasten in wäßrigem Äthanol [61, 79].

Ordinaten: links: Absorptionsänderung $\Delta I/I$.
rechts: Sauerstoffproduktion [mm³O₂/(mg Chl)·Std.].

Abszisse: Volumenverhältnis Äthanol/Wasser.

Chl-b von diesem Stoff getrennt, ohne daß dessen Funktion beeinträchtigt wird. Unter normalen Verhältnissen ändern sich wahrscheinlich bei einer Reaktion von X die optischen Eigenschaften des in der Umgebung befindlichen Chlorophyll-b. Die damit verbundenen Absorptionsänderungen spiegeln dann quantitativ die Reaktion von X. Wegen der Indikation durch Chl-b verwenden wir für X das Symbol (Chl-b).

[79] B. Rumberg, unveröffentlicht.

Die Absorptionszunahme in $< 10^{-5}$ sec entspricht der Bildung eines Derivates (Chl-b)', die Absorptionsabnahme im Dunkeln in ca. 10^{-2} sec die Rückbildung von (Chl-b).

5. Reduktion von (Chl-b)

Durch Zusatz von Dichlorphenol-indophenol + K₃[Fe(CN)₆] im Überschuß wurde das Differenzspektrum von Chl-b chemisch separiert. K₃[Fe(CN)₆] hat dabei nur sekundäre Bedeutung. Einerseits unterbindet es als Elektronenakzeptor I den Weiterlauf des Cyclus I (siehe Abschnitt IV, 8), andererseits hält es das Dichlorphenol-indophenol im oxydierten Zustand. Mit zunehmender Konzentration an Dichlorphenol-indophenol nimmt die Geschwindigkeit der Rückbildung von (Chl-b) aus (Chl-b)' sehr stark zu [51, 78] (Abb. 14).

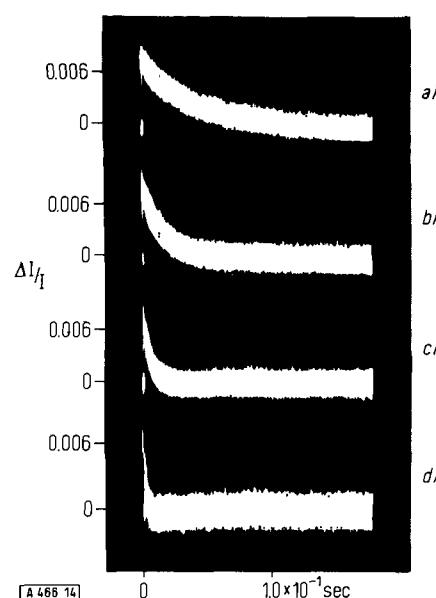


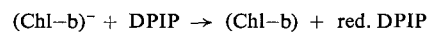
Abb. 14. Zeitlicher Verlauf der Absorptionsänderung von Chlorophyll-b bei 515 m μ in Spinat-Chloroplasten in Abhängigkeit von der Konzentration an 2,6-Dichlorphenol-indophenol [51, 78].

(a) $3,75 \times 10^{-5}$ M, (b) $5,1 \times 10^{-5}$ M, (c) $7,8 \times 10^{-5}$ M, (d) $1,6 \times 10^{-4}$ M. Die Halbwertszeiten der Rückreaktion betragen: (a) 24 msec, (b) 11 msec, (c) 4 msec, (d) 1 msec.

Ordinate: Absorptionsänderung $\Delta I/I$.

Abszisse: Zeit [sec].

Es läßt sich zeigen, daß Dichlorphenol-indophenol im Verlauf der Rückreaktion reduziert wird. (Chl-b)' muß daher eine im Licht gebildete reduzierte Form von (Chl-b) sein, die in der Dunkelreaktion durch Dichlorphenol-indophenol (DPIP) oxydiert wird [51]:



Aus dem zeitlichen Verlauf der Dunkelreaktion ergibt sich, daß sie pseudo-erster Ordnung ist. Daraus wurde die Geschwindigkeitskonstante ermittelt zu $k = 1,62 \times 10^6 \text{ l} \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ [*] und die Aktivierungsenergie zu $E_A = 7,4 \text{ kcal/Mol}$ [51].

[*] Genauere Messungen ergaben diesen Wert, der sich etwas von dem in [51] angegebenen unterscheidet.

6. Künstliche Elektronenakzeptoren II für (Chl-b)⁻

Es wurden verschiedene Stoffe mit Redoxpotentialen zwischen -0,44 und +0,43 Volt auf ihr Reaktionsvermögen mit (Chl-b)⁻ untersucht. Dabei erwiesen sich die in Tabelle 3 genannten Stoffe als Elektronenakzeptoren für (Chl-b)⁻ [51]. Sie werden als „künstliche Elektronenakzeptoren II“ bezeichnet.

Tabelle 3. Künstliche Elektronenakzeptoren II, die Elektronen von (Chl-b)⁻ übernehmen können [51].

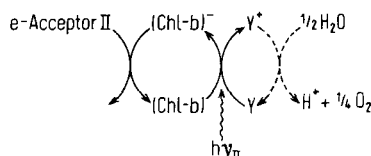
	Redox-potential (pH = 6,5) [Volt]
Methylenblau	+0,03
Thionin	+0,08
Toluylenblau	+0,14
Thymol-indophenol	+0,20
2.6.3'-Trichlorphenol-indophenol	+0,26
2.6-Dichlorphenol-indophenol	+0,26
Phenol-indophenol	+0,26

7. Das Redoxpotential von (Chl-b)

Da nur Stoffe mit einem Redoxpotential ≥ 0 Volt mit (Chl-b)⁻ reagieren (Tabelle 3), muß das Redoxpotential von (Chl-b) ca. 0 Volt betragen [51].

8. Wasser als natürlicher Elektronendonator für (Chl-b)

Aus dem bisher Gesagten folgt, daß mit Licht ein Elektron von einem unbekannten Stoff Y auf (Chl-b) übertragen wird. (Chl-b)⁻ kann das Elektron an einen der



Schema 3. Wasser als natürlicher Elektronendonator für (Chl-b).

Elektronenakzeptoren II abgeben. Der endständige Elektronendonator ist Wasser (Schema 3). Dies folgt aus verschiedenen Beobachtungen:

- N-p-Chlorphenyl-N'-dimethylharnstoff blockiert die Wasserspaltung (d.h. die O₂-Produktion) [80]. Bei steigendem Zusatz dieses Giftes treten auch die mit der separierten (Chl-b)-Reaktion verbundenen Absorptionsänderungen nicht mehr in Erscheinung (Abb. 19 rechts, Mitte) [46, 53].
- Bei der chemisch separierten (Chl-b)-Reaktion besteht unter verschiedenen Bedingungen ein quantitativer Zusammenhang zwischen (Chl-b)-Reduktion und Sauerstoffproduktion [61].
- Ferner besteht ein quantitativer Zusammenhang zwischen der Sauerstoffproduktion und der Reduktion von Dichlorphenol-indophenol (Elektronenakzeptor II).

[80] N. I. Bishop, Biochim. Biophysica Acta 27, 205 (1958).

9. Der Elektronenüberträger Y

Da die Elektronenübertragung auf (Chl-b) in $< 10^{-5}$ sec erfolgt (Abb. 11), die Befreiung des Elektrons aus dem Wasser aber ca. 10^{-3} sec dauert [81] (Abschn. X), muß zwischen (Chl-b) und Wasser mindestens ein Überträger Y mit einer Reaktionszeit von 10^{-3} sec existieren. Chlorophyll-a_{II} (siehe Abschnitt V, 11) kann mit Y nicht identisch sein, denn bisher wurden am Chl-a_{II} keine 10^{-3} sec dauernden Absorptionsänderungen beobachtet.

10. Der natürliche Elektronenakzeptor für (Chl-b)⁻

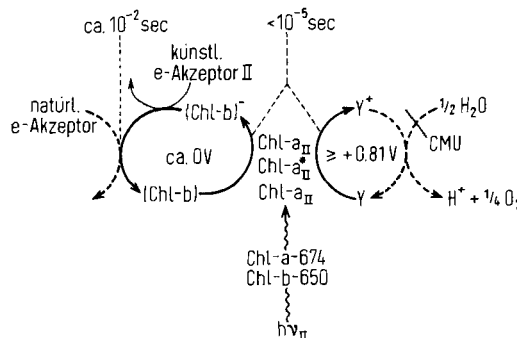
Um die (Chl-b)-Reaktion vom übrigen Zellgeschehen chemisch zu separieren, haben wir durch die Elektronenakzeptoren II den Elektronenfluß zu einem natürlichen Elektronenakzeptor verhindert. Der separierte Prozeß wird Reaktionscyclus II genannt. Der natürliche Elektronenakzeptor ist zunächst unbekannt. Man kann aus dem zeitlichen Verlauf der Absorptionsänderungen (Abb. 11) jedoch schließen, daß der Elektronenübergang zu diesem Akzeptor bei 20 °C ca. 10^{-2} sec dauert.

11. Chlorophyll-a_{II} als Sensibilisator des Reaktionscyclus II

Welches photochemisch aktive Pigment sensibilisiert den Reaktionscyclus II? Chlorophyll-b ist ein Indikator-Molekül und kommt daher für diese Funktion nicht in Frage. Aussagen erhält man aus dem Aktionsspektrum des Reaktionscyclus II (siehe Abschnitt VI). Aus ihm folgt, daß ein Chlorophyll-a-Molekül – wir bezeichnen es als Chl-a_{II} – die Reaktion sensibilisieren muß [63]. Offenbar vermittelt das angeregte Chl-a_{II}-Molekül eine Elektronenübertragung von Y nach (Chl-b), mit so großer Geschwindigkeit, daß die Reaktion von Chl-a_{II} durch Absorptionsänderung bisher nicht erkannt werden konnte.

12. Schema des Reaktionscyclus II

Faßt man alle bisher beschriebenen Beobachtungen zusammen, so erhält man für den Reaktionscyclus II das im Schema 4 wiedergegebene Bild.



Schema 4. Elektronenfluß im Reaktionscyclus II [54, 55, 61, 62, 74].

[81] J. Vater, H. Rüppel u. H. T. Witt, unveröffentlicht.

Bei Lichtabsorption ($h\nu$) bewirkt der angeregte Zustand Chl-a_1^* die Übertragung eines Elektrons von Y auf (Chl-b) in $< 10^{-5}$ sec. (Chl-b) besitzt ein Redoxpotential von ca. 0 Volt. Der Elektronenübergang von $(\text{Chl-b})^-$ auf den natürlichen Elektronenakzeptor erfolgt bei 20°C in ca. 10^{-2} sec. Wasser ist der endständige Elektronendonator, d.h. Y^+ wird durch Wasser reduziert unter Freisetzung von $\frac{1}{4}\text{O}_2$ und H^+ . Das Redoxpotential von Wasser ist + 0,81 Volt (pH = 7). Das Redoxpotential von Y^+/Y muß dann $\geq 0,81$ Volt betragen [46]. Durch Abfangen des Elektrons von $(\text{Chl-b})^-$ mit den in Tabelle 3 aufgeführten künstlichen Elektronenakzeptoren II läßt sich der Cyclus II vom übrigen Zellgeschehen separieren. Die quantitative Separierung des Cyclus II ist außer von der Konzentration des Elektronenakzeptors II abhängig von der Belichtungsdauer, der Blitzfrequenz und der Konzentration an $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ [82]. Wie Kessler [15] zeigte, sind an der Wasserspaltung Mangan-Ionen beteiligt.

Der separierte Cyclus II muß verantwortlich sein für das System, das Losada et al. [38] beschrieben haben: O_2 -produzierende Chloroplasten mit Zusatz von Dichlorphenol-indophenol und $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, die unfähig sind, ATP zu bilden.

Die Eigenschaften des separierten Reaktionscyclus II sind in Tabelle 2 und Abbildung 19, rechts, zusammengestellt [61, 74, 82].

13. Zusammenhang zwischen (Chl-b) und Plastochinon

Bishop [83] hat gezeigt, daß Chloroplasten bei der Extraktion mit Petroläther die Fähigkeit zur Wasserspaltung verlieren, bei anschließender Kondensation von Plastochinon jedoch ihre photochemische Aktivität zurückgewinnen. Daraus wurde geschlossen, daß Plastochinon in der Photosynthese eine Rolle spielt. Das Redoxpotential von Plastochinon beträgt ca. 0 Volt, das von (Chl-b) ebenfalls ca. 0 Volt [51]. Diese Übereinstimmung und der folgende Versuch führten zu dem Ergebnis, daß beide Stoffe im Zusammenhang stehen müssen: Nach Extraktion von Plastochinon verschwindet das Differenzspektrum von Chl-b. Nach Kondensation von synthetischem Plastochinon tritt es wieder voll in Erscheinung (Abb. 15) [58, 75, 84]. Wir haben daher versucht, die Beteiligung von Plastochinon am Elektronentransport direkt nachzuweisen.

14. Das Differenzspektrum von Plastochinon (Q-254)

In vitro ist die chemische Plastochinon-Reduktion durch Absorptionsänderungen im ultravioletten Spektralbereich (Maximum bei $254\text{ m}\mu$) gekennzeichnet [90]. Bei der Belichtung von Spinat-Chloroplasten [57] und *Chlorella*-Zellen [60] tritt ein ähnliches Differenzspektrum auf (Abb. 2g). Plastochinon (Q-254) wird in vivo also wie (Chl-b) bei der Belichtung reduziert.

15. Die Reaktion von Plastochinon im Reaktionscyclus II

Die Absorptionsänderungen von Q-254 beobachtet man auch am chemisch separierten Reaktionscyclus II (Abb. 19, rechts) [59]. Da nach Schema 4 Sauerstoffentwicklung und Reduktion von (Chl-b) miteinander verknüpft

[82] B. Rumberg, P. Schmidt-Mende, U. Siggel, B. Skerra u. H. T. Witt, Z. Naturforsch., im Druck.

[83] N. I. Bishop, Proc. nat. Acad. Sci. USA 45, 1696 (1959).

[84] H. T. Witt in W. Ruhland: Handbuch der Pflanzenphysiologie. Springer, Berlin 1960, Bd. V/1, S. 63.

sind, sollten bei Beteiligung von Plastochinon am Cyclus II [53, 85] die Sauerstoffentwicklung sowie die Absorptionsänderungen von Chl-b und Plastochinon verschwinden, wenn man das Plastochinon extrahiert. Nach Rekondensation von Plastochinon sollten sie wieder auftreten. Die Absorptionsänderungen von Chl-a₁ im Cyclus I müssen von diesen Eingriffen unbeeinflusst bleiben. Die in Abbildung 15 gezeigten Ergebnisse bestätigen dies [59, 61].

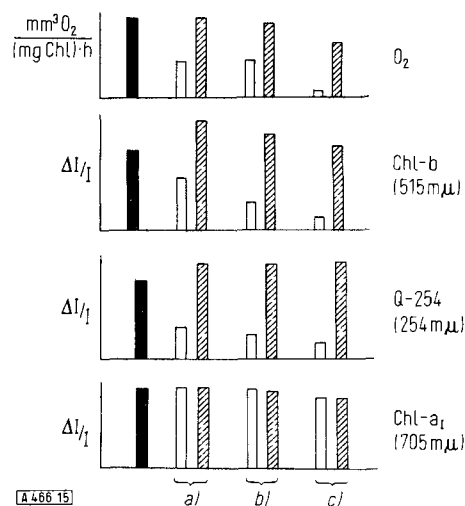


Abb. 15. Relative Sauerstoffproduktion und Absorptionsänderungen von Chlorophyll-b, Plastochinon und Chlorophyll-a₁ in Spinat-Chloroplasten unter normalen Bedingungen (schwarze Rechtecke), nach Extraktion von Plastochinon mit Petroläther (weiße Rechtecke) und nach anschließender Kondensation von synthetischem Plastochinon (schraffierte Rechtecke). Die mit a), b) und c) bezeichneten Gruppen unterscheiden sich durch verschieden starke Extraktion mit Petroläther [59, 61].

16. Die Eigenschaften der Plastochinon-Reaktion

Die Eigenschaften der Plastochinon-Reaktion stimmen quantitativ mit der (Chl-b)-Reaktion überein (Abb. 19, rechts): pH-Bereich 5–8, Temperaturbereich $< 40^\circ\text{C}$, empfindlich gegen N-p-Chlorphenyl-N'-dimethylharnstoff [61]. Die Größe der Absorptionsänderungen von Plastochinon hängt vom O_2 -Gehalt der Chloroplasten-Suspension ab. Daraus kann man auf eine Oxydation von Q-254^- durch O_2 schließen [59, 60]. Dieser Elektronenübergang ist langsam (Sekunden). Er ist im Schema 8 durch einen Pfeil gekennzeichnet.

17. Chlorophyll-b als Indikator für die Plastochinon-Reaktion

(Chl-b) und Q-254 haben ungefähr das gleiche Redoxpotential, beider Absorptionsänderungen verschwinden, wenn man Plastochinon extrahiert, beide werden reduziert, wenn man den separierten Cyclus II anregt, und beide Reaktionen haben die gleichen Eigenschaften. Diese Übereinstimmungen lassen vermuten, daß (Chl-b) und Q-254 identisch sind, d.h. daß die Absorptionsänderungen von Chlorophyll-b die Plastochinon-Reaktion anzeigen [58, 61]. Außerdem stimmt der zeitliche Verlauf der Absorptionsänderungen bei 515 und $254\text{ m}\mu$

[85] H. T. Witt, A. Müller u. B. Rumberg, Angew. Chem. 73, 507 (1961).

unter verschiedenen Bedingungen überein [59,61]. Abbildung 16 zeigt dies am Beispiel verschiedener Anregungszeiten. Auch die Größe der Absorptionsänderungen hängt für Chlorophyll-b und Plastochinon in gleicher Weise von der Dauer des anregenden Blitzes ab. Bei langdauernden Blitzes (10^{-1} sec) ist die Menge des an der Reaktion beteiligten Plastochinons etwa viermal so groß wie bei der Anregung mit Blitzes von $\leq 10^{-3}$ sec Dauer (Abb. 16) [59–61].

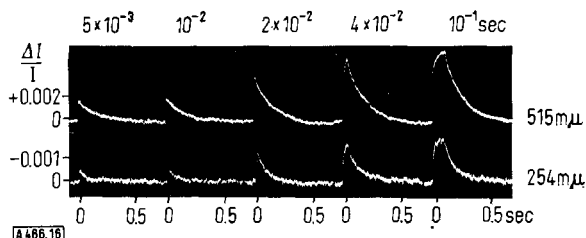


Abb. 16. Zeitlicher Verlauf der Absorptionsänderungen bei 515 mμ (Chlorophyll-b) und 254 mμ (Plastochinon) in Chlorella-Zellen in Abhängigkeit von der Dauer des anregenden Blitzes (Zahlen über der Abbildung) [61].

Ordinate: Absorptionsänderung $\Delta I/I$.
Abszisse: Zeit [sec].

18. Plastosemichinon

Unter bestimmten Bedingungen findet man Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Absorptionsänderungen bei 515 und 254 mμ, die auf die Beteiligung von Plastosemichinon und -hydrochinon deuten. Es ist noch nicht erwiesen, welche von den beiden reduzierten Formen durch Chlorophyll-b angezeigt wird.

VI. Die Aktionsspektren der separierten Reaktionscyclen I und II

Der separierte Cyclus I kann optisch durch die Absorptionsänderung von Chl-a_I, z.B. bei 430 mμ, und chemisch durch die Reduktionsgeschwindigkeit des Elektronenakzeptors I, z.B. Benzylviologen, ausgemessen werden; der separierte Cyclus II optisch durch die Absorptionsänderung von Chl-b, z.B. bei 515 mμ, und chemisch durch die Geschwindigkeit der Sauerstoffproduktion. Abbildung 17 zeigt die Aktionsspektren für die separierten Cyclen I und II, die auf diese Weise ermittelt wurden [59,63].

Die optisch gemessenen Aktionsspektren sind genauer als die chemisch ermittelten. Die Schultern und Maxima der Spektren zeigen, welche Typen aus der Masse der photochemisch inaktiven Chlorophyll-Moleküle die Reaktionszentren Chl-a_I und Chl-a_{II} durch Energieleitung mit Energie versorgen. Chl-a_I wird über die Chlorophylle Chl-a-682, Chl-a-695 und wahrscheinlich auch über Chl-b-650 versorgt (Schema 2), Chl-a_{II} durch Chl-a-650 und Chl-a-674 (Schema 4). Der Cyclus I läßt sich mit Licht der Wellenlänge < 730 mμ anregen, der Cyclus II nur mit Licht der Wellenlänge < 700 mμ (Abb. 17).

Das Absorptionsmaximum des aktiven Chlorophylls im Cyclus II muß nach den Regeln der Energiewanderung

bei längeren Wellenlängen liegen als das Maximum der die Energie zuführenden Chlorophyll-Moleküle (674 mμ). Maxima oberhalb 674 mμ gehören zum Chlorophyll-a-Typ, d.h. ein Chlorophyll-a muß das aktive Molekül

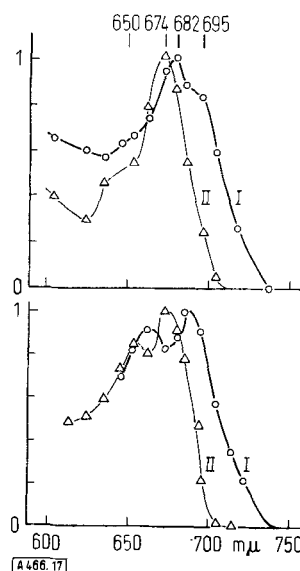


Abb. 17. Aktionsspektren der separierten Reaktionscyclen I und II, gemessen an Spinat-Chloroplasten [59,63].

Ordinaten: oben: Relative Absorptionsänderung von Chl-a_I bei 433 mμ (I) und von Chl-b bei 515 mμ (II).
unten: Relative Benzylviologen-Reduktion (I) und relative O₂-Produktion (II).

Abszisse: Wellenlänge des Erregerlichtes [mμ] (gleiche Zahl eingestrahler Quanten).

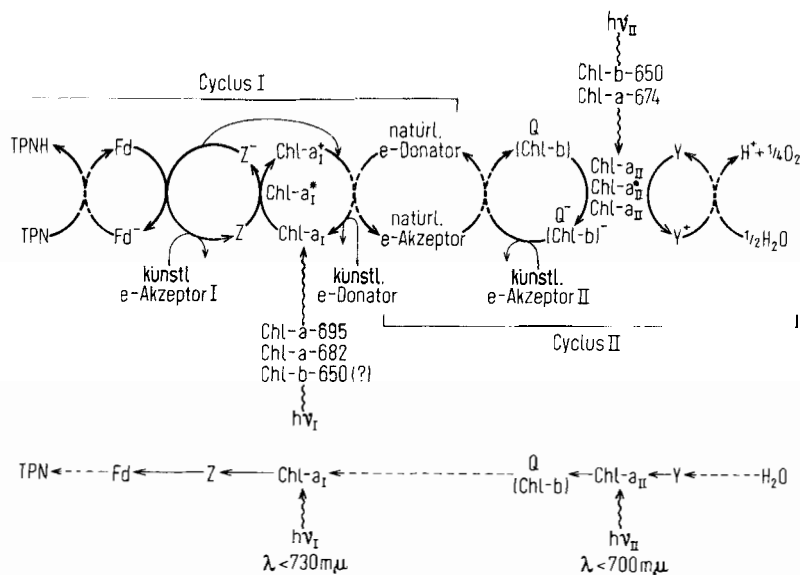
im Cyclus II sein [63]. Von diesem Ergebnis wurde schon im Abschnitt V,11 Gebrauch gemacht. Das aktive Molekül wurde dort als Chl-a_{II} bezeichnet. Das gleiche Ergebnis wurde bereits aus dem Emerson-Effekt abgeleitet [23].

VII. Quantitative Koppelung der Reaktionscyclen I und II im vollständigen System

Für den Cyclus I (Schema 2) ist der natürliche Elektronendonator, für den Cyclus II (Schema 4) der natürliche Elektronenakzeptor unbekannt. Die Vermutung liegt nahe, daß als natürlicher Elektronendonator für den Cyclus I der Cyclus II fungiert und als natürlicher Elektronenakzeptor für den Cyclus II der Cyclus I (Schema 5). Diese Koppelung beider Cyclen im vollständigen System läßt sich durch vier Demonstrationen beweisen.

1. Demonstration am Chlorophyll-a_I

Abbildung 17 zeigt, daß Chl-a_I z.B. mit Licht der Wellenlänge 720 mμ (nur $h\nu_I$) oxydiert werden kann (Absorptionsabnahme bei 703 mμ), ohne daß Chl-a_{II} erregt wird. Bei anschließender Einstrahlung von Licht z.B. der Wellenlänge 638 mμ ($h\nu_I$ und $h\nu_{II}$) sollte auch Chl-a_{II} erregt werden und einen Elektronenübergang vom



Schema 5. Koppelung der Reaktionscyclen I und II im vollständigen System [46, 54, 55, 62, 74].

Unten: vereinfachtes Strichschema.

Wasser zum Plastochinon bewirken. Im Falle einer Koppelung der Cyclen I und II muß Q^- das $Chl-a_1^+$ reduzieren, d.h. die Absorption bei 703 $m\mu$ muß zunehmen. Dies wird durch Abbildung 18, oben, bestätigt [59, 60].

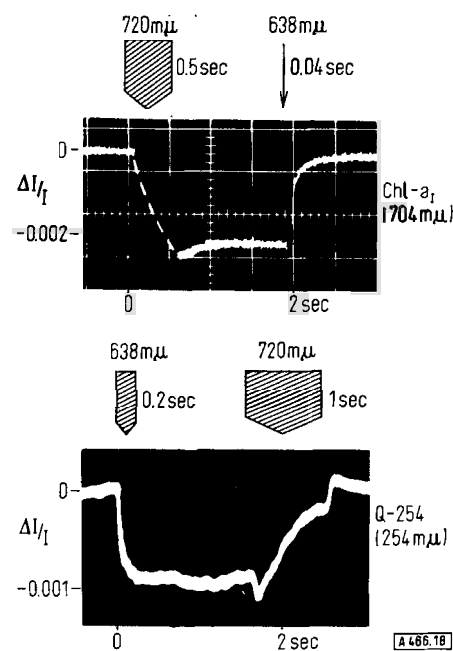


Abb. 18. Zeitlicher Verlauf der Absorptionsänderungen von Chlorophyll- a_1 (704 $m\mu$) bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 720 $m\mu$ und 638 $m\mu$ (oben) und von Plastochinon (254 $m\mu$) bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 638 $m\mu$ und 720 $m\mu$ (unten). Versuchsobjekt oben: Spinat-Chloroplasten, unten: *Chlorella*-Zellen [59, 60].

Ordinate: Absorptionsänderung $\Delta I/I$.
Abszisse: Zeit [sec].

2. Demonstration am Plastochinon

Abbildung 17 zeigt, daß Plastochinon (Chl-b) z.B. mit Licht der Wellenlänge 638 $m\mu$ ($h\nu_I$ und $h\nu_{II}$) reduziert werden kann. Dieses Licht oxydiert auch $Chl-a_1$ (Abb. 17). Nach längerer Dunkelzeit wird aber vorwiegend Plastochinon reduziert. Dies erkennt man daran, daß bei Belichtung die Absorption bei 254 $m\mu$ abnimmt und

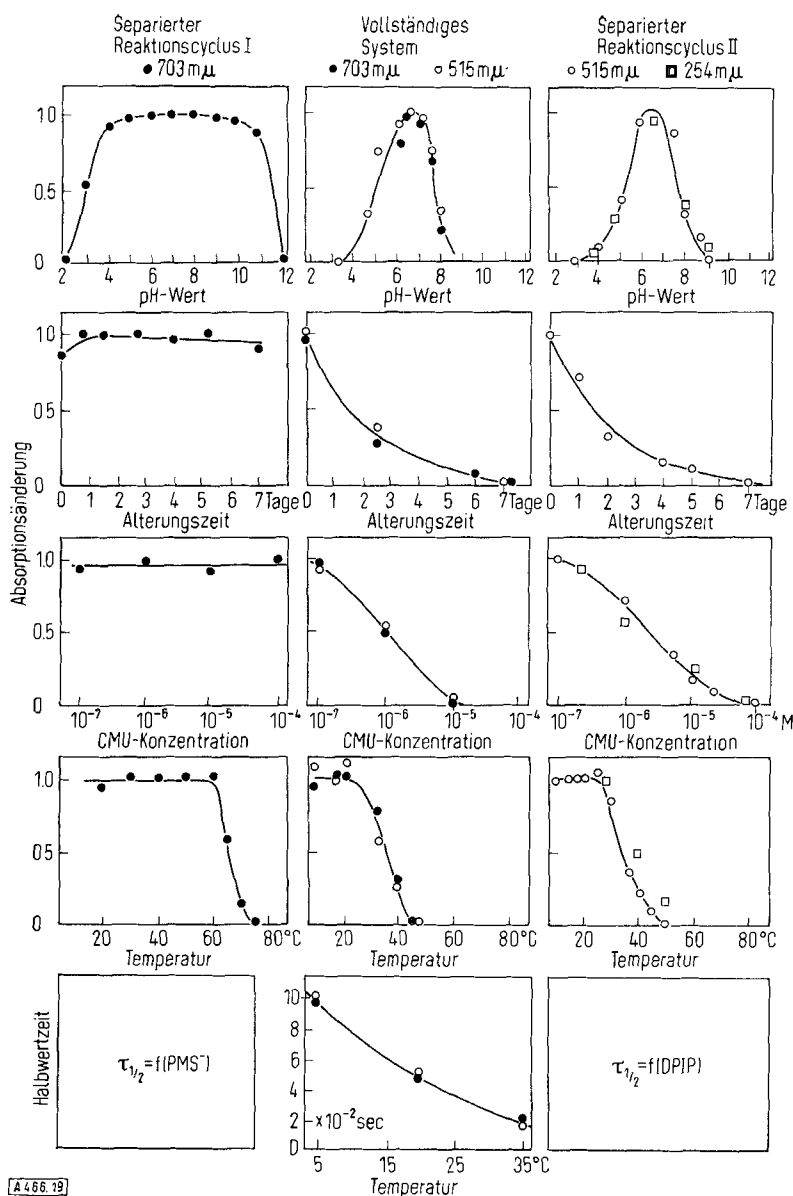
unmittelbar nach dem Ausschalten des Lichtes keine Reoxydation stattfindet (Abb. 18, unten). Bei anschließender Einstrahlung von Licht der Wellenlänge 720 $m\mu$ (nur $h\nu_I$) wird ausschließlich $Chl-a_1$ oxydiert. Im Falle einer Koppelung der Cyclen I und II müßte $Chl-a_1^+$ das Elektron von Q^- akzeptieren, und die Absorption bei 254 $m\mu$ müßte zunehmen. Abbildung 18, unten, zeigt, daß dies der Fall ist [59, 60].

3. Demonstration durch gemeinsame Eigenschaften

Die Eigenschaften der separierten Cyclen I und II sind in Tabelle 2 und in Abbildung 19 gegenübergestellt. Sie unterscheiden sich erheblich. Bei Koppelung sollten beide Cyclen aber die gleiche Abhängigkeit von verschiedenen Parametern zeigen. Um dies zu demonstrieren, wird zunächst nur $Chl-a_1$ durch Einstrahlung von Dauerlicht der Wellenlänge 720 $m\mu$ (nur $h\nu_I$) oxydiert (Absorptionsabnahme bei 703 $m\mu$). Bei Koppelung zwischen den Cyclen sollte bei zusätzlicher Blitzlichteinstrahlung, z.B. der Wellenlänge 638 $m\mu$ ($h\nu_I$ und $h\nu_{II}$), die Reduktion von $Chl-a_1^+$, also die Absorptionszunahme bei 703 $m\mu$, abhängig sein von der Reduktion von Plastochinon bzw. (Chl-b) im Cyclus II, d.h. die Absorptionszunahme bei 703 $m\mu$ und die Änderung bei 515 $m\mu$ sollten im gekoppelten System dieselbe Abhängigkeit zeigen wie die Absorptionsänderung bei 515 $m\mu$ im separierten Cyclus II (Abb. 19, rechts). Die gute Übereinstimmung (Abb. 19, Mitte) demonstriert, daß die Koppelung zwischen den Cyclen I und II quantitativ ist [60, 82].

4. Kinetische Demonstration

Im vollständigen System zeigen die Absorptionszunahme bei 703 $m\mu$ und die Abnahme bei 515 $m\mu$ bei verschiedenen Temperaturen gleiche Halbwertszeiten (Abb. 19 Mitte, unten). Dadurch wird auch kinetisch die quantitative Koppelung zwischen den beiden Cyclen bewiesen [60,



[A 466.19]

Abb. 19. Links: Abhängigkeit des separierten Reaktionscyclus I von verschiedenen Parametern, gemessen an Hand der negativen Absorptionsänderung von Chlorophyll- a_1 bei 703 mμ.

Rechts: Abhängigkeit des separierten Reaktionscyclus II von verschiedenen Parametern, gemessen an Hand der Absorptionsänderung von Chlorophyll-b bei 515 mμ und Plastochinon bei 254 mμ.

Mitte: Abhängigkeit der Reaktionscyclen I und II im vollständigen System von verschiedenen Parametern, gemessen an Hand der positiven Absorptionsänderung von Chlorophyll- a_1 bei 703 mμ und der Absorptionsänderungen von Chlorophyll-b bei 515 mμ.

Versuchsobjekte: Spinat-Chloroplasten; für die Messung der Halbwertszeiten: *Chlorella*-Zellen [60, 82].

CMU = N-p-Chlorphenyl-N'-dimethylharnstoff.

DPIP = Dichlorphenol-indophenol.

PMS⁻ = reduziertes N-Methylphenazonium-methylsulfat.

82]. Die Halbwertszeiten charakterisieren den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zwischen Cyclus I und II; er dauert ca. 4×10^{-2} sec bei 25 °C. In Abhängigkeit vom Zellzustand mißt man bei 25 °C im Mittel 1×10^{-2} bis 4×10^{-2} sec [60, 82].

5. Rückkoppelung zwischen den Cyclen I und II; Reduktion von (Chl-b) durch Erregung von Chl- a_1 und Chl- a_{II}

Das Differenzspektrum von Chl-b wird durch Anregung von Chl- a_{II} erzeugt. Es wurde bisher noch nicht hervorgehoben, daß dies nur für etwa die halbe Amplitude gilt.

Die andere Hälfte wird durch Erregung von Chl- a_1 verursacht. Dafür sprechen folgende Beobachtungen:

a) Bei ausschließlicher Anregung von Chl- a_{II} (durch Desaktivierung des Cyclus I mit Dichlorphenol-indophenol + $K_3[Fe(CN)_6]$, Abb. 10c) ist die Amplitude des Differenzspektrums von Chl-b nur etwa halb so groß wie bei Normalbedingungen (Abschnitt V,1, Abb. 10a) [59].

b) Bei ausschließlicher Anregung von Chl- a_1 (z.B. mit Licht der Wellenlänge 720 mμ, nur $h\nu_I$) verschwindet das Differenzspektrum von Chl-b nicht. Es tritt nur verkleinert auf [53], bei Sättigungsintensitäten etwa mit halber Amplitude [63, 82, 95].

c) Mit zunehmender Anregung von Chl- a_1 durch Dauerlicht (z.B. $\lambda = 728$ mμ, nur $h\nu_I$) nehmen die durch zusätzliches Blitzlicht (z.B. $\lambda = 638$ mμ, $h\nu_I$ und $h\nu_{II}$) erregbaren Absorptionsänderungen von Chl-b bis auf etwa die Hälfte ab (Abb. 20). Das Dauerlicht sättigt offenbar den Anteil an (Chl-b), der durch Chl- a_1 erregt werden kann [52].

Diese Ergebnisse zeigen, daß – wie bisher diskutiert – (Chl-b) bei Erregung des Cyclus II reduziert wird, daß (Chl-b) aber außerdem durch Rückfluß von Elektronen

aus dem Cyclus I reduziert werden kann [52, 82]. Dieser Rückfluß von Elektronen von Z^- nach (Chl-b) ist im Schema 8 durch einen gestrichelten Pfeil angedeutet.

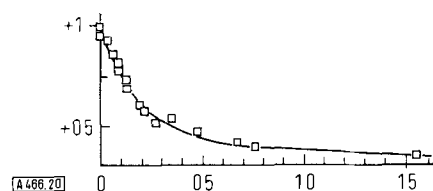


Abb. 20. Durch Blitzlicht ausgelöste Absorptionsänderungen von Chlorophyll-b bei 515 mμ in Abhängigkeit von der Bestrahlungsstärke des Zusatzdauerlichtes ($\lambda = 728 \text{ m}\mu$). Versuchsobjekt: *Chlorella*-Zellen [52].

Ordinate: Relative Absorptionsänderung.
Abszisse: Bestrahlungsstärke [$10^5 \text{ erg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$].

Nach Desaktivierung des Cyclus II durch Zusatz von N-p-Chlorphenyl-N'-dimethylharnstoff (Abschnitt V,8) treten die Absorptionsänderungen von Chl-b bei Belichtung wieder auf, wenn man der Chloroplasten-Suspension Dichlorphenol-indophenol + überschüssiges Ascorbat zusetzt [54]. Diese Änderungen können durch alleinige Anregung von Chl- a_1 mit Licht der Wellenlänge 720 mμ (nur $h\nu_1$) erzeugt werden [82]. Offenbar kann anstelle von H_2O auch Ascorbat (über Dichlorphenol-indophenol) als Elektronendonator für Plastochinon dienen (Schema 8).

6. Eindeutigkeit der Repräsentation des Cyclus II durch Chlorophyll-b [61]

1. Die für den Cyclus II typischen Absorptionsänderungen um 478, 513 und 648 mμ finden am Chlorophyll-b statt (Abschnitt V,3).
2. Chlorophyll-b ist nur ein Indikator, der durch die Reaktion eines anderen Stoffes [(Chl-b), Plastochinon] zu Absorptionsänderung veranlaßt wird (Abschnitt V,4).
3. Bestimmte Eingriffe in die Chloroplasten können zur Entkoppelung zwischen Chlorophyll-b und Plastochinon führen (Abschnitt V,4).
4. (Chl-b) ist durch Chl- a_1 und auch durch Rückkoppelung vom Cyclus I aus reduzierbar (Abschnitt VII,5).
5. Daraus folgt, daß die Absorptionsänderungen von Chl-b nur dann ausschließlich und eindeutig den Cyclus II repräsentieren, wenn das durch den Cyclus I induzierbare Differenzspektrum von Chl-b unterdrückt wird. Dies ist der Fall a) bei chemischer Desaktivierung des Cyclus I (Zusatz eines Elektronenakzeptors $\text{II} + \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Abschnitt V,1) oder b) bei Sättigung der vom Cyclus I ausgehenden Rückkoppelung durch Zusatzdauerlicht der Wellenlänge 700–730 mμ (nur $h\nu_1$) (Abschnitt VII,5).

Diese Punkte wurden bei der Ermittlung der Eigenschaften des Cyclus II stets beachtet.

VIII. Die Zwischenprodukte

Im blauen Spektralbereich zwischen 400 und 460 mμ verbleibt ein bisher ungeklärter Unterschied zwischen dem komplexen Differenzspektrum bei Normalbedingungen und dem Differenzspektrum des Chl- a_1 (vgl. Abb. 22a und e). Der Unterschied kommt durch die

Überlagerung der Absorptionsänderungen eines Cytochrom-f und eines Cytochrom-b zustande [56].

1. Das Differenzspektrum von Cytochrom-f-407-424-555 und dessen Separierung

Schnelle ($< 10^{-1} \text{ sec}$) lichtinduzierte Cytochrom-f-Reaktionen können normalerweise an grünen Zellen nicht nachgewiesen werden. Durch drei Eingriffe [62] ins Zellsystem kann man jedoch erzwingen, daß Absorptionsänderungen auftreten, die durch die bekannte Chl- a_1 -Oxydation und eine sonst nicht sichtbare Cyt-f-Oxydation verursacht werden (Abb. 21): a) Belichtung bei tiefen Temperaturen (-150°C) [46], b) alleinige Erregung des Cyclus I, z. B. mit Licht der Wellenlänge 710 mμ (nur $h\nu_1$) [53], c) Zusatz von Dichlorphenolindophenol zu Chloroplasten [55].

Die gestrichelt gezeichneten Änderungen um 700 mμ bei -150°C (Abb. 21a) zeigen die Beteiligung von Chl- a_1 an. Bei Zusatz von N-Methylphenazonium-methylsulfat erhält man bei -150°C nur das Differenzspektrum von Chl- a_1 (Abb. 3e) [46]. Subtrahiert man dieses von dem in Abbildung 21a und 21b gezeigten Spektrum, so erhält

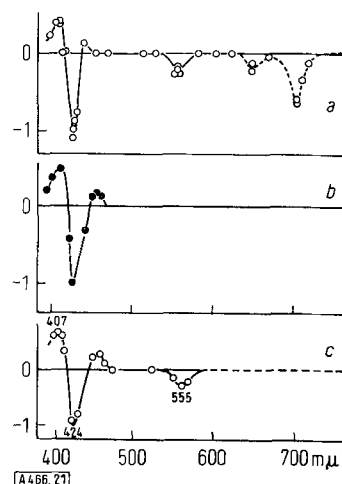


Abb. 21. An belichteten Spinat-Chloroplasten (a, c) und *Chlorella*-Zellen (b) gemessene Differenzspektren.

- (a) -150°C , kein Zusatz; gestrichelte Kurve: Absorptionsänderung von Chl- a_1 ; ausgezogene Kurve: Absorptionsänderungen von Cyt-f und Chl- a_1 [46].
(b) 25°C , Anregung mit Licht der Wellenlänge 710 mμ [53].
(c) 25°C , Zusatz von Dichlorphenol-indophenol [55].

Kurve (c) stellt das separierte Differenzspektrum bei der Oxydation des Cyt-f-407-424-555 dar.

Ordinate: Relative Absorptionsänderung.
Abszisse: Wellenlänge [mμ].

man das gleiche Differenzspektrum, wie bei chemischer Oxydation [86] eines Cytochrom-f in vitro. Bei Zusatz von Dichlorphenol-indophenol unterscheidet sich die Kinetik des Chl- a_1 -Differenzspektrums so sehr von der des Cyt-f-Differenzspektrums, daß man das Differenzspektrum der Cyt-f-Oxydation direkt erhält (Abb. 21c) [55]. Das Redoxpotential von Cyt-f in vivo wurde zu 0,4 Volt geschätzt [53], in vitro beträgt es 0,37 Volt [86].

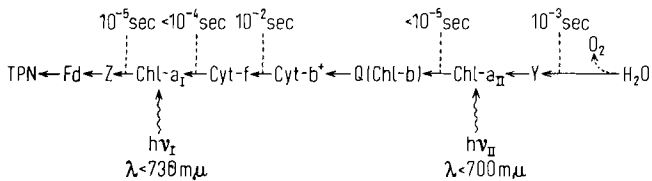
[86] H. E. Davenport u. R. Hill, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B, 139, 327 (1952).

2. Der Chl- a_1 -Cyt-f-Komplex

Der Unterschied zwischen den in Abbildung 3e und 21a gezeigten Differenzspektren bei -150°C kann gedeutet werden durch einen Komplex zwischen Chl- a_1 und Cyt-f [46,47]. Bei Belichtung wird primär Chl- a_1 oxydiert. Durch die komplexe Bindung kann Cyt-f auch bei -150°C Chl- a_1^+ reduzieren. Weitere Lichtquanten oxydieren Chl- a_1 zum zweiten Male, so daß Chl- a_1^+ und Cyt- f^+ in Erscheinung treten (Abb. 21a). Bietet man bei -150°C Chl- a_1^+ anstelle von Cyt-f einen künstlichen Elektronendonator an (z.B. $> 10^{-4}$ M reduziertes N-Methylphenazonium-methylsulfat), so kann Cyt-f nicht mehr als Elektronendonator dienen und nicht oxydiert werden; es tritt nur das Differenzspektrum der Chl- a_1 -Oxydation in Erscheinung (Abb. 3e) [47].

3. Das Differenzspektrum von Cytochrom-b-412-435-563 und dessen Separierung

Cytochrom-f ist nicht nur unter den drei im Abschnitt VIII,1 beschriebenen Bedingungen, sondern auch unter normalen Verhältnissen am Elektronentransport beteiligt, allerdings in Gemeinschaft mit Cytochrom-b. Cytochrom-f liegt im Dunkeln in reduzierter, Cytochrom-b in oxydierter Form vor. Cytochrom-b befindet sich zwischen Cyt-f und Plastochinon (Schema 6) [56]. Dafür spricht folgende Beobachtung: Bei alleiniger Erregung



Schema 6. Lage von Cytochrom-b und Cytochrom-f in der Photosynthesekette [47, 56].

von Chl- a_1 , z.B. mit Licht der Wellenlänge $720\text{ m}\mu$ (nur $h\nu_I$), werden Chl- a_1 und anschließend Cyt-f oxydiert. Es muß die Summe der Differenzspektren dieser beiden Stoffe auftreten (Abb. 22b).

Bei anschließender Erregung von Chl- a_1 und Chl- a_{II} , z.B. mit Licht der Wellenlänge $650\text{ m}\mu$ ($h\nu_I$ und $h\nu_{II}$), hält das $h\nu_I$ -Licht Chl- a_1 und Cyt-f im oxydierten Zustand; nach Schema 6 sollte das $h\nu_{II}$ -Licht Cyt- b^+ durch einen Elektronenübergang von Wasser über Y und Plastochinon reduzieren. Dabei kann nur das Differenzspektrum auftreten, das durch eine Reduktion von Cyt- b^+ verursacht wird (Abb. 22c). Es entspricht dem, das man bei der chemischen Reduktion von Cyt- b^+ in vitro erhält.

Das Redoxpotential von Cyt-b in vitro beträgt $-0,03$ Volt [87].

Die Cytochrome können unter normalen Bedingungen nicht direkt in Erscheinung treten, weil die Oxydation von Cyt-f und die Reduktion von Cyt- b^+ zu einer uncharakteristischen Interferenz der damit verbundenen Absorptionsänderungen führen (Abb. 22c und 22d). Cyto-

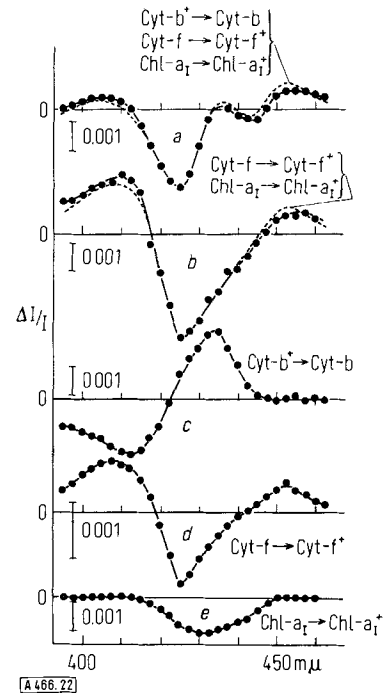


Abb. 22. (a) Komplexes Differenzspektrum von belichteten Spinat-Chloroplasten unter normalen Bedingungen (ausgezogene Linie); Summe der separierten Differenzspektren c-e (gestrichelte Linie) [56].

(b) Differenzspektrum bei Belichtung mit $\lambda = 720\text{ m}\mu$ (ausgezogene Kurve); Summe der separierten Differenzspektren d und e (gestrichelte Kurve).

(c) Differenzspektrum von Cytochrom-b bei Belichtung mit $\lambda = 650\text{ m}\mu$ nach Vorbelichtung mit $\lambda = 720\text{ m}\mu$.

(d) Differenzspektrum von Cytochrom-f bei Zusatz von Dichlorphenol-indophenol (vgl. Abb. 21c).

(e) Differenzspektrum von Chlorophyll- a_1 in gealterten Chloroplasten (vgl. Abb. 3b).

Ordinate: Absorptionsänderung $\Delta I/I$.

Abszisse: Wellenlänge $[\text{m}\mu]$.

chrom-f tritt jedoch durch die im Abschnitt VIII,1 angeführten Eingriffe in Erscheinung (Abb. 21), weil durch diese die Cyt-b-Reaktion unterdrückt und die Interferenz vermieden wird:

a) Bei tiefen Temperaturen werden die Elektronenübergänge zum Cyt- b^+ blockiert.

b) Bei alleiniger Erregung von Chl- a_1 mit Licht der Wellenlänge $710\text{ m}\mu$ (nur $h\nu_I$) findet die Reduktion des Cyt- b^+ nicht statt.

c) Bei Zusatz von Dichlorphenol-indophenol werden die Elektronen schon am Plastochinon Q abgefangen, wodurch die Reduktion von Cyt- b^+ verhindert wird. Als Elektronendonator für Cyt-f dient in diesem Fall das von Q^- reduzierte Dichlorphenol-indophenol.

IX. Quantitative Analyse der bei der Photosynthese auftretenden kurzzeitigen Absorptionsänderungen

Die Analyse der Absorptionsänderungen zwischen 400 und $800\text{ m}\mu$ ist vollständig, wenn die Summe der separierten Differenzspektren von Chl- a_1 , Chl-b, Cyt-f und Cyt-b das komplexe Differenzspektrum unter Normalbedingungen (Abb. 3a oder 10a) ergibt. Die Absorptionsänderungen bei $703\text{ m}\mu$ kommen ausschließlich

[87] R. Hill, Nature (London) 174, 501 (1954).

durch Chl- a_1 zustande (Abb. 3), die bei 648 m μ durch Chl- a_1 und Chl-b, die bei 478 und 513 m μ ausschließlich durch Chl-b (Abb. 10). Zwischen 400 und 450 m μ treten die Absorptionsänderungen von Chl- a_1 , Cyt-f und Cyt-b in Erscheinung. Ihre separierten Differenzspektren sind in Abbildung 22c-e dargestellt. Die Summe ergibt die in Abbildung 22a gestrichelte Kurve, die ausgezeichnet mit dem komplexen Differenzspektrum unter normalen Bedingungen (ausgezogene Kurve, Abb. 22a) übereinstimmt [56].

X. Geschwindigkeit der Wasserspaltung

Emerson et al. haben an *Chlorella*-Zellen bei Anregung mit periodischen Blitzen die Sauerstoffausbeute in Abhängigkeit von der Dunkelzeit zwischen den Blitzen gemessen (Blitzlichtmanometrie). Die Zeit für die halbe maximale Ausbeute wurde als die Halbwertszeit des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes der Gesamtreaktion interpretiert (ca. 10^{-2} sec bei 20 °C) [16, 84]. Wir haben diese Methode erneut angewendet, jedoch mit wesentlichen Veränderungen: wir bestimmten die Sauerstoffausbeute im separierten Reaktionscyclus II und wählten die Konzentration von Dichlorphenol-indophenol so hoch, daß die Elektronen von (Chl-b) $^-$ sehr schnell abgefangen wurden (5×10^{-4} sec), so daß diese Reaktion nicht geschwindigkeitsbestimmend war. Messungen unter diesen Bedingungen sollten unmittelbar Informationen über den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zwischen H $_2$ O und Chl- a_{II} ergeben. Um eindeutige Resultate zu erhalten, verwendeten wir periodisches Blitzlicht und Blitzlichtgruppen.

Erste Beobachtungen bei Anregung mit Blitzlichtgruppen sprachen für einen zweiphasigen durch Halbwertszeiten von ca. 10^{-1} und 10^{-3} sec charakterisierbaren Verlauf der O $_2$ -Bildung [41]. Mit periodischem Blitzlicht ergab sich eine Halbwertszeit von 10^{-2} sec, die durch das Zusammenwirken der 10^{-1} und 10^{-3} sec dauernden Teilreaktionen erklärt wurde. Neue Messungen [81] zeigten, daß die mit 10^{-1} sec charakterisierte Reaktion durch einen Aktivitätsabfall der Chloroplasten vorgetäuscht wurde. Man findet sowohl bei Anregung mit Blitzlichtgruppen als auch mit periodischem Blitzlicht einen einphasigen, nur durch die Halbwertszeit von $\tau_{1/2}^A \approx 2 \times 10^{-3}$ sec (20 °C) charakterisierbaren Verlauf der O $_2$ -

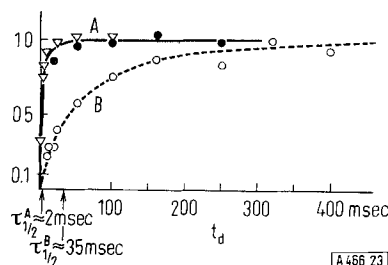


Abb. 23. Relative Sauerstoffausbeute pro Blitz in Abhängigkeit von der Dunkelzeit t_d zwischen den Blitzen [81]. Versuchsobjekt: Spinat-Chloroplasten bei 20 °C.

Kurve A: Am separierten Reaktionscyclus II bei Anregung mit Doppelblitzen (∇) und periodischen Blitzen (\bullet).

Kurve B: Am vollständigen Reaktionssystem bei Anregung mit periodischen Blitzen (\circ).

Ordinate: (O $_2$ -Menge pro Blitz bei t_d)/(O $_2$ -Menge pro Blitz bei $t_d = 320$ msec).

Abszisse: Dunkelzeit t_d zwischen den Blitzen [msec].

Bildung (Abb. 23, Kurve A). Diese Halbwertszeit entspricht der Reaktionsgeschwindigkeit der Wasserspaltung.

XI. Geschwindigkeit der Gesamtreaktion und Lokalisierung der geschwindigkeitsbestimmenden Reaktion

Versuche mit periodischem Blitzlicht am vollständigen Chloroplastensystem (Cyclen I und II) bei Zusatz von Elektronenakzeptoren I wie K $_3$ [Fe(CN) $_6$] ergaben in Übereinstimmung mit Messungen von Clendenning et al. [88] eine Halbwertszeit von $\tau_{1/2}^B \approx 3,5 \times 10^{-2}$ sec bei 20 °C (Abb. 23, Kurve B) für die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion. Dieser Wert stimmt sehr gut mit demjenigen überein, den wir im Abschnitt VII,4 aus Absorptionsänderungen für den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zwischen den Cyclen I und II in *Chlorella*-Zellen hergeleitet haben: 1×10^{-2} bis 4×10^{-2} sec bei 25 °C. Daraus folgt, daß die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion des Gesamtprozesses zwischen den Cyclen I und II lokalisiert ist.

XII. Die Anomalien bei fernrotem Dauerlicht

Fernrotes Licht ($\lambda = 700$ bis 730 m μ , nur $h\nu_1$) bewirkt ausschließlich die Erregung von Chl- a_1 im Cyclus I (Abb. 17). Mißt man bei der Anregung mit Blitzen z. B. der Wellenlänge 638 m μ ($h\nu_1$ und $h\nu_{II}$) die Absorptionsänderungen von Chl- a_1 bei 703 m μ in Abhängigkeit von der Intensität des fernroten Zusatzdauerlichts, so ergeben sich folgende Resultate (Abb. 24): Bei mittlerer Intensität des Dauerlichtes (b in Abb. 24) beobachtet man an *Chlorella* bei Blitzlichteinstrahlung (Zeit t_3) die schon beschriebenen Absorptionsänderungen (Abb. 4). Bei schwacher Intensität I des Dauerlichtes (bis zum Wert $I \rightarrow 0$) verschwinden die Absorptionsänderungen bei Blitzeinstrahlung (Zeit t_1) nahezu vollständig (a in Abb. 24). Bei starker Intensität des Dauerlichtes (Zeit t_5) verschiebt sich der Nullpunkt der Absorptionsänderungen; dadurch treten positive Absorptionsänderungen in Erscheinung (Abb. 24c), die schon von Kok am Pigment 700 beobachtet wurden [43].

1. Der Chl- a_1 -Cyt-f-Komplex

Die Deutung für die Kurven a und b in Abbildung 24 ergibt sich aus der Existenz eines Chl- a_1 -Cyt-f-Komplexes [46] (vgl. Abschnitt VIII,1). Bei schwachem Zusatzdauerlicht (Kurve a) liegen Chl- a_1 und Cyt-f reduziert vor. Bei Blitzlichteinstrahlung (t_1) wird Chl- a_1 in $< 10^{-5}$ sec oxydiert und im Komplex von Cyt-f so schnell wieder reduziert ($< 10^{-4}$ sec), daß die damit verbundenen Absorptionsänderungen nicht beobachtet werden können [52]. (Auf diese Weise war es möglich, das Differenzspektrum von Chl-b von dem des Chl- a_1 physikalisch zu trennen; Abschnitt V,1) Bei mittlerer Intensität des Dauerlichtes (Kurve b) wird Cyt-f permanent oxydiert. Bei Blitzeinstrahlung (t_3) wird auch Chl- a_1 oxydiert. Die Reduktion von Chl- a_1 kann nicht schneller

[88] K. A. Clendenning u. H. C. Ehrmantraut, Arch. Biochem. 29, 387 (1950).

erfolgen als der Nachtransport eines Elektrons aus dem Cyclus II über Cyt-f⁺. Die Zeit dafür beträgt ca. 10^{-2} sec (Abschnitt VII,4). Bei starker Intensität des Dauerlichtes (Kurve c) wird neben Cyt-f auch ein Teil des Chl-a₁ permanent oxydiert. Blitzlichteinstrahlung (t_5) kann nur den reduziert verbliebenen Teil von Chl-a₁ oxydieren.

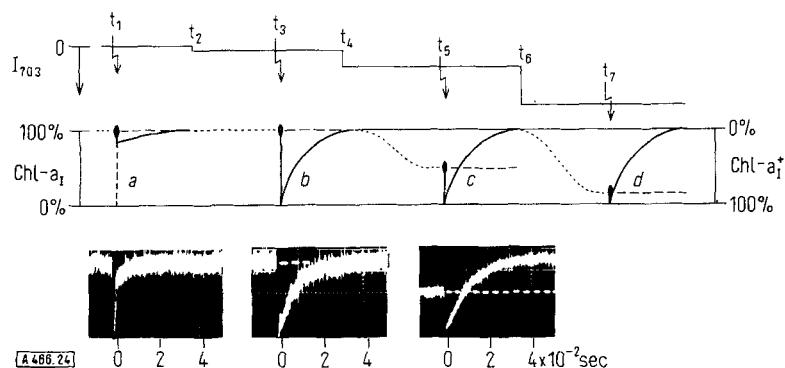


Abb. 24. Zeitlicher Verlauf der Absorptionsänderung von Chlorophyll-a₁ bei 703 mμ (unten) in Abhängigkeit von der Intensität des Zusatzdauerlichtes (oben) [89]. Wellenlänge des Dauerlichtes: 703 mμ. Versuchsobjekt: *Chlorella*-Zellen. — Ein Verlauf nach Kurve d wird in *Chlorella*-Zellen experimentell nicht gefunden (siehe Text, Abschnitt XII,1). Zur Zeit $t = 0$ wurde Blitzlicht von 10^{-5} sec Dauer eingestrahlt. Ordinate: Oben: Intensität des Dauerlichtes bei 703 mμ. Unten: Relative Absorptionsänderung bei 703 mμ. Mitte: Absorptionsänderung umgerechnet auf % Chl-a₁ (links) und % Chl-a₁⁺ (rechts).

Abszisse: Zeit [sec].

Die negativen Absorptionsänderungen sind deshalb entsprechend kleiner. Die aus dem Cyclus II gelieferten Elektronen reduzieren das durch Zusatzdauerlicht und Blitzlicht oxydierte Chl-a₁⁺, wobei es zu positiven, die Null-Linie überschreitenden Absorptionsänderungen kommen muß. Alle diese Beobachtungen sind im Einklang mit dem bisher entworfenen Reaktionsschema. Unverständlich bleibt, daß Dauerlicht *sehr starker* Intensität Chl-a₁ nicht vollständig, sondern nur zu maximal 50% oxydiert. Bei vollständiger Oxydation müßte man Kurve d in Abb. 24 erwarten. Da dies nicht beobachtet wird, verhalten sich ca. 50% des Chl-a₁ anders als der Rest.

2. Die Elektronenakzeptoren I für Z⁻

Entsprechende Messungen an Chloroplasten (Abb. 24 gilt für *Chlorella*-Zellen) zeigen positive Absorptionsänderungen erst nach Zusatz eines der in Tabelle 1 genannten Elektronenakzeptoren I (Abb. 25a,b). Dies ist verständlich: ohne den Elektronenakzeptor I fließen die Elektronen von Z⁻ nach Chl-a₁⁺ zurück (Schema 2). Dadurch kann das Zusatzdauerlicht keine Anreicherung von Chl-a₁⁺ bewirken. Elektronenakzeptoren I unterbinden den Rückfluß und ermöglichen so eine Anreicherung von Chl-a₁⁺. Blitzeinstrahlung (t_2) oxydiert dann den Rest von Chl-a₁.

Der Elektronentransport aus dem Cyclus II dauert wie bei *Chlorella* ca. 10^{-2} sec; er bewirkt die Reduktion des Chl-a₁⁺ und die damit verbundene Absorptionzunahme (Abb. 25b). Durch den Übergang der negativen Absorptionsänderungen (Abb. 25a) in die positiven (Abb. 25b)

[89] B. Rumberg, Dissertation, Technische Universität Berlin, 1965.

wurden die mit Z⁻ reagierenden Elektronenakzeptoren I ermittelt (Abschnitt IV,8) [48,62].

Mit Elektronenakzeptoren I verringert sich die Gesamtabsorptionsänderung um 50% (Abb. 25a,b). Erst bei Einstrahlung von Blitzen mit einer Dauer $\geq 10^{-3}$ sec (t_3) treten positive Absorptionsänderungen auf, die in ihrer

Größe den negativen entsprechen (Abb. 25a,c). Auch in Chloroplasten verhalten sich also ca. 50% der Chl-a₁-Moleküle anders als der Rest.

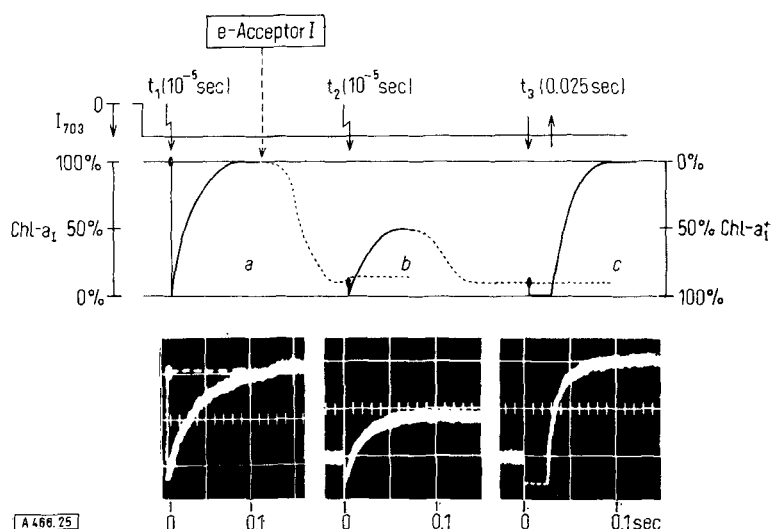
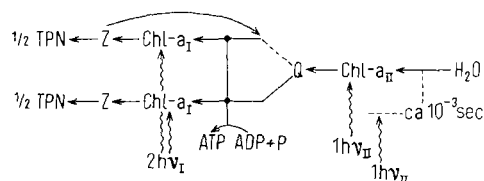


Abb. 25. Zeitlicher Verlauf der Absorptionsänderung von Chlorophyll-a₁ bei 703 mμ (unten) in Abhängigkeit von der Intensität des Zusatzdauerlichtes (oben) [89]. Wellenlänge des Dauerlichtes: 703 mμ. Versuchsobjekt: Spinat-Chloroplasten. Ordinate: oben: Intensität des Dauerlichtes bei 703 mμ. unten: Relative Absorptionsänderung bei 703 mμ. Mitte: Absorptionsänderung umgerechnet auf % Chl-a₁ (links) und % Chl-a₁⁺ (rechts).

Abszisse: Zeit [sec].

3. Zwei Chl-a₁-Reaktionen

Offenbar sind 50% der Chl-a₁-Moleküle an einer Reaktion beteiligt, die bisher noch nicht erfaßt wurde. Möglicherweise läuft dem Cyclus I ein zweiter Chl-a₁-Cyclus parallel (Schema 7). Dabei ist anzunehmen, daß bei

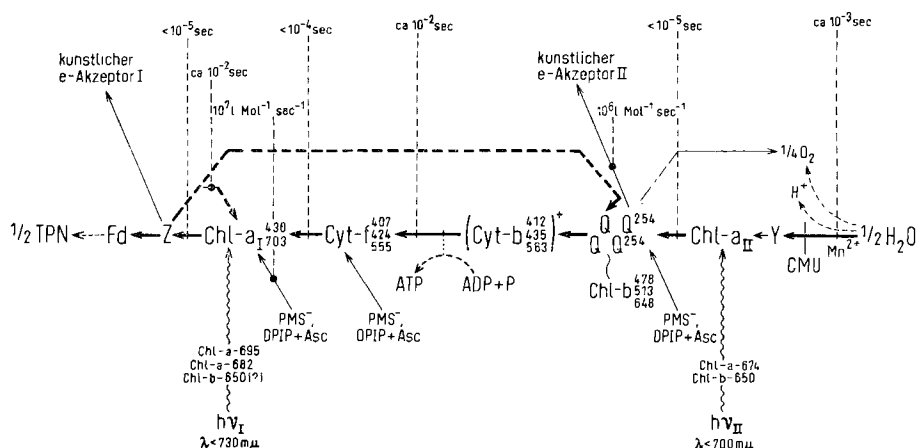


Schema 7. Zwei parallele Chl-a₁-Cyclen. (Über die Reaktion $\text{ADP} + \text{P} \rightarrow \text{ATP}$ siehe Abschnitt XIII,3).

Chlorella in einem der Chl- a_I -Cyclen ein cyclischer Elektronenfluß stattfindet (gebogener Pfeil in Schema 7 oben), da nur 50% des Chl- a_I als Chl- a_I^+ angereichert werden können (Abschnitt XII,1). Die Verdoppelung der positiven Absorptionsänderungen an Chloroplasten bei einer Blitzdauer $\geq 10^{-3}$ sec (Abb. 25c) steht mit der Reaktionsgeschwindigkeit der Wasserspaltung (10^{-3} sec, Abschnitt X) in Zusammenhang: In $\geq 10^{-3}$ sec können mindestens zwei Elektronen vom Wasser zum Plastochinon und weiter zum Chl- a_I^+ übertragen werden.

XIII. Die Gesamtreaktion

1. Der Elektronenfluß



Schema 8. Elektronentransport bei der Photosynthese [74].

TPN = Triphosphopyridinnucleotid

Fd = Ferredoxin

Z = experimentell ermittelte, chemisch jedoch unbekannte Zwischenstufe

Chl- a_I = Chlorophyll- a_I

Cyt-f = Cytochrom-f

Cyt-b = Cytochrom b

Q = Plastochinon

Chl-b = Chlorophyll-b

Chl- a_{II} = Chlorophyll- a_{II}

Y = experimentell ermittelte, chemisch jedoch unbekannte Zwischenstufe

ATP = Adenosintriphosphat

ADP = Adenosindiphosphat

P = Phosphat

CMU = N-p-Chlorphenyl-N'-dimethylharnstoff

PMS⁺ = reduziertes N-Methylphenazonium-methylsulfat

DPIP = 2,6-Dichlorphenol-indophenol

Asc = Ascorbat.

Die Zahlen neben den Symbolen Chl, Cyt und Q bedeuten die Maxima der Absorptionsänderungen. Die Zeitangaben bedeuten die Dauer der Elektronenübergänge.

Im Schema 8 sind alle bisher ermittelten Ergebnisse zusammengestellt. Es zeigt den Transport von Elektronen vom Wasser über Zwischenstufen zum TPN. Die fetten ausgezogenen Pfeile geben die Richtung des Elektronenflusses an, die fetten gestrichelten Pfeile zeigen den cyclischen Elektronenfluß von Z^- nach Chl- a_I^+ und Q. Die dünnen Pfeile entsprechen dem Elektronenfluß in Chloroplasten unter künstlichen Bedingungen: a) Abfangen der Elektronen von Z^- durch Elektronenakzeptoren I (Abschnitt IV, 8); b) Abfangen von Elektronen am (Chl-b) bzw. Plastochinon durch Elektronenakzeptoren II (Abschnitt V,6) und durch Sauerstoff (Abschnitt V,17). Elektronendonatoren, wie PMS und DPIP (mit Ascor-

bat) können angekoppelt werden an c) Chl- a_I (Abschnitt IV,4), d) Cyt-f (Abschnitt VII,3) und e) Plastochinon (Abschnitt VII,5). Die Schlangenlinien symbolisieren die eingestrahelten Lichtquanten. Die Zeiten geben die Dauer der Elektronenübergänge an. Die Energieschwellen werden durch Aufnahme von Energie in Chl- a_I und Chl- a_{II} überwunden. Diesen Molekülen wird die Energie des absorbierten Lichtes durch Energieleitung zugeführt. An der Versorgung von Chl- a_I sind die Chlorophyll-Typen Chl-a-695, Chl-a-682 und wahrscheinlich Chl-b-650 beteiligt, an der Versorgung von Chl- a_{II} die Typen Chl-a-674 und Chl-b-650. Chl- a_I läßt sich mit Licht der Wellenlänge < 730 m μ anregen, Chl- a_{II} mit Wellenlängen < 700 m μ . Chl- a_I hat im angeregten Zustand (Chl- a_I^*) ein so niedriges Redoxpotential ($< -0,44$ Volt), daß es Z (Redoxpotential $< -0,44$ Volt) reduzieren

kann. Chl- a_{II}^* bewirkt einen Elektronenübergang von Y zum Plastochinon Q. Das Elektron von Z^- wird über Ferredoxin und Flavoprotein auf TPN übertragen. Y^+ wird von Wasser reduziert unter Bildung von H^+ und $1/4 O_2$. Chl- a_I^+ wird durch Cyt-f reduziert und Cyt-f⁺ durch Elektronenabgabe von Q^- (über Cyt-b⁺). Wir haben Cyt-b⁺ in Klammern gesetzt, weil seine Position in der Kette noch nicht genau bekannt ist.

2. Das Energiediagramm

Anhand der Redoxpotentiale der Zwischenprodukte ist es möglich, ein Energiediagramm für den Elektronentransport aufzustellen (Schema 9).

3. Phosphorylierung

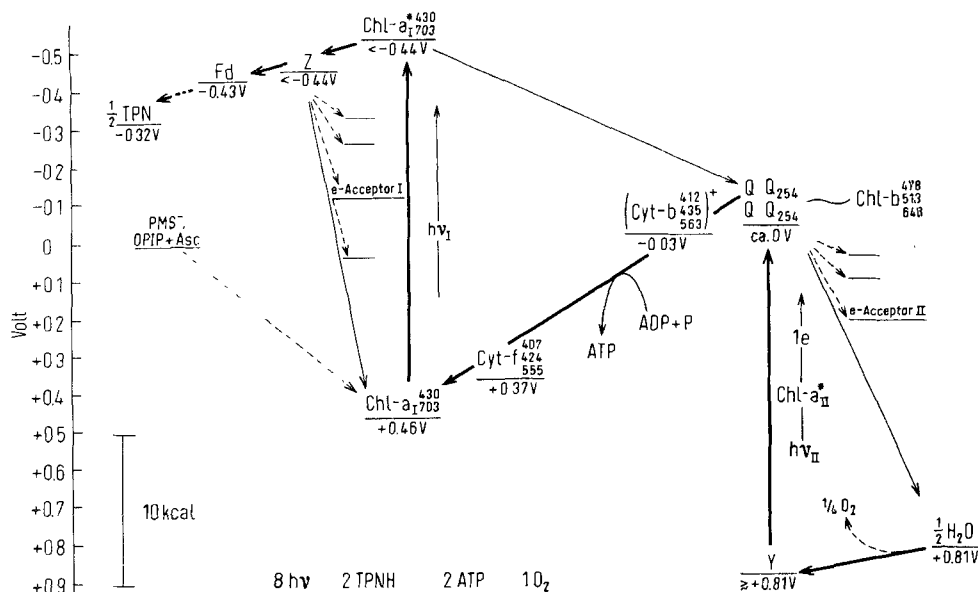
Aus den Redoxpotentialen folgt, daß beim Elektronenübergang vom Q zum Cyt-f eine Energie von ca. 10 kcal/Mol frei wird. Sie kann benutzt werden, um aus ADP und Phosphat ATP zu bilden. Daher wurde der Phosphorylierungsschritt in den Schemata 8 und 9 an dieser Stelle eingetragen [46,53].

4. Quantenausbeute

Aus Schema 8 und 9 kann man ablesen, daß bei der Absorption von 8 Lichtquanten ($4h\nu_I + 4h\nu_{II}$) 2 TPNH, 2 ATP und 1 O_2 gebildet werden. (Die Bildung von 2

ATP folgt aus dem Befund, daß beim Fluß von zwei Elektronen 1 Molekül ATP entsteht [9]). Eine vergleichbare Quantenausbeute findet man bei der direkten Messung: 8–10 Quanten pro O_2 -Molekül (Abschnitt 1,6). Nach dem Calvin-Cyclus werden aber für die CO_2 -

Die sehr schnelle Chlorophyll- a_1 -Reaktion [44, 45] (siehe Abschnitt III) ist in Schema 8 und 9 nicht berücksichtigt worden. Vielleicht steht sie mit den angeregten Chl- a -Molekülen in Zusammenhang.



Schema 9. Energiediagramm des im Schema 8 dargestellten Elektronentransportes bei der Photosynthese [74].
Ordinate: Redoxpotential.

Reduktion 2 TPNH und 3 ATP benötigt [5]. Das dritte ATP-Molekül kann beim Rückfluß der Elektronen von Z^- nach Q (gestrichelter Pfeil im Schema 8) gebildet werden. Dazu werden zwei weitere Lichtquanten benötigt, so daß für die Bildung von 2 TPNH, 3 ATP und 1 O_2 insgesamt zehn Lichtquanten nötig sind.

5. Stöchiometrie der Primär- und Zwischenprodukte

Aus den Extinktionskoeffizienten der Pigmente in vitro und der Größe der Absorptionsänderungen in vivo ergibt sich für Chl- a_1 [47], Cyt-f und Cyt-b [56] eine Konzentration in vivo, die ca. 1000-mal kleiner ist als die gesamte Chlorophyllmenge. Dies stimmt mit den aus Sauerstoff-Messungen ermittelten Befunden überein, daß nur ein Tausendstel aller Chlorophyll-Moleküle photochemisch wirksam ist (Abschnitt 1,5). Andererseits steht das aus Extinktionskoeffizienten und Absorptionsänderungen errechnete Verhältnis Chl- a_1 :Cyt-f:Cyt-b \approx 1:1:1 mit dem Reaktionsschema in Einklang. Bei der Anregung mit langen Blitzen (10^{-1} sec, Abb. 16) ergab sich für das aktive Plastochinon eine Konzentration die ca. viermal größer ist als die von Chl- a_1 , Cyt-f und Cyt-b [60] (die Gesamtmenge des Plastochinons ist sogar 40-mal größer [90]). Dies steht im Einklang mit der Tatsache, daß extrahiertes Plastochinon in seine ursprüngliche Position zurückkondensiert werden kann. Dies ist nur möglich, wenn sich zwischen den Cyclen I und II eine größere Menge Plastochinon befindet.

[90] F. I. Crane, Plant Physiol. 34, 128, 546 (1959).

Die Triplett-Zustände von Chlorophyll- a_0 und Chlorophyll- b_0 [64] (Abschnitt III) wurden in vivo bisher nur nach Veränderung der Chloroplastenstruktur und Desaktivierung der Photosynthese nachgewiesen. Falls diese Zustände an der Photosynthese beteiligt sind, muß ihre Lebensdauer kleiner als 10^{-5} sec sein [64].

Ke [91] hat die in den Abschnitten IV,2 und IV,4 aufgeführten Ergebnisse bestätigen können.

Amesz [92] hat die von uns an Chloroplasten (Abschnitt V,15) [57] und Chlorella-Zellen (Abschnitt VII,2) [60] optisch nachgewiesene Plastochinon-Reduktion durch Messungen an Chlorella-Zellen und Blaualgen bestätigt.

Chance et al. [93] leiteten aus kinetischen Untersuchungen der Cytochrom-Reaktionen in Bakterien ab, daß die Primärvorgänge nur in Zeiten $< 10^{-5}$ sec ablaufen. Sie stellten daher den Chl- a_1 -Prozeß in grünen Zellen, der nach unseren Messungen eine Halbwertszeit von $< 10^{-4}$ sec, bei Zusatzdauerlicht aber 10^{-2} sec, besitzt (Abschnitt XII), als Primärvorgang in Frage. Dieser Schluß ist aber nicht zutreffend, da die Oxydation von Cytochrom-f bei Zusatzdauerlicht (Abschnitt XII,1) nicht berücksichtigt wurde.

Duysens [42] fand an Rotalgen ein durch langwellige Bestrahlung verursachtes Differenzspektrum von Cytochrom. Nach unseren Ergebnissen (Abschnitt VIII,1) tritt unter diesen Bedingungen aber stets die Oxydation von Cyt-f und Chl- a_1 gemeinsam auf. Das von Duysens angegebene Differenzspektrum setzt sich demnach aus Absorptionsänderungen zusammen, die durch die Oxydation von Cyt-f und Chl- a_1 verursacht werden.

Messungen von Chance [94], Rubinstein [95], Fork [96] und Kok et al. [70c] führten zu uneinheitlichen Vorstellungen über die Bedeutung der Absorptionsänderungen um 515 m μ . Diese finden aber z.T. Aufklärung, wenn man die im Abschnitt VII,6 angeführten Ergebnisse berücksichtigt.

[91] B. Ke, Biochim. biophysica Acta 90, 289, 297 (1964).

[92] I. Amesz, I., Biochim. biophysica Acta 79, 257 (1964).

[93] B. Chance u. D. Devault, Ber. Bunsenges. physikal. Chem. 68, 722 (1964).

[94] B. Chance u. R. Sager, Plant Physiol. 32, 548 (1957).

[95] D. Rubinstein u. E. Rabinowitch, Biophysic. 4, 107 (1964).

[96] D. C. Fork u. Y. de Kouchkovsky, Annual Rep. Carnegie Inst., Dept. Plant Biol. 63, 441 (1964).

Schema 8 beschreibt den mit Hilfe der Blitzlichtmethoden bisher ermittelten Elektronentransport bei der Photosynthese. Es erklärt den Emerson-Effekt (Abschnitt I,7) und eine Vielzahl von bisher unverstandenen Phänomenen; es steht in Einklang mit neueren Ergebnissen, die mit anderen Methoden ermittelt wurden [1–4]. Es läßt aber auch neue Probleme sichtbar werden (Abschnitt

XII,3). Durch weitere Messungen wird man das Schema ergänzen und verfeinern müssen. Von besonderem Interesse sind Einzelheiten über den Mechanismus der Wasserspaltung im Reaktionscyclus II, über den Mechanismus der Phosphorylierung und über die Struktur des beschriebenen Elektronentransportsystems.

Eingegangen am 21. April 1965 [A 466]

Neue Untersuchungen mit Hilfe des optischen Circular dichroismus

VON PROF. DR. L. VELLUZ UND DR. M. LEGRAND [*]

CENTRE DE RECHERCHES ROUSSEL-UCLAF, PARIS (FRANKREICH)

Ein erstmals 1961 beschriebenes Gerät, mit dem sich der Circular dichroismus bis herab zu 220 m μ messen ließ, ist verbessert worden und gestattet jetzt Messungen bis herab zu 185 m μ . Untersuchungen an Dienen, konjugierten Ketonen und Verbindungen mit aromatischem Ring werden an Hand einiger Beispiele beschrieben. Besonders eingehend wurden Proteine analysiert mit folgenden Ergebnissen: 1. Polypeptide mit Helixstruktur zeigen im fernen Ultraviolett einen komplexen Circular dichroismus mit drei Komponenten bei 192, 204 und 225 m μ , die für eine helixartige Anordnung der Peptidgruppen charakteristisch sind. – 2. Menschliches Serumalbumin zeigt einen ähnlichen Circular dichroismus wie die helixartig gebauten Polypeptide, woraus sich schließen läßt, daß es zu 60 % Helixstruktur hat. – 3. Messungen des Circular dichroismus zeigen, daß die Protein-Denaturierung mit Harnstoff reversibel ist. – 4. 2-Chloräthanol erhöht den Helixgehalt von menschlichem Serumalbumin und von Clupein, hat aber auf die Struktur von Poly-L-glutaminsäure nur einen geringen Einfluß. – 5. Die Öffnung von Disulfidbrücken im menschlichen Serumalbumin erleichtert den Angriff von Denaturierungsmitteln (z. B. Harnstoff). – 6. Oberflächenaktive Stoffe unterstützen die Aufrechterhaltung der Struktur des menschlichen Serumalbumins nach der Öffnung von Disulfidbrücken.

Einleitung

Seit das erste Gerät zur Messung des optischen Circular dichroismus im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich in unserem Laboratorium [1] entwickelt wurde, hat die Methode vielfache Anwendung zur Analyse optisch aktiver Strukturen gefunden. Die Zahl der Arbeiten, die seit unserer ersten Veröffentlichung [2] erschienen sind, zeigt, wie nützlich diese Methode zur Aufklärung räumlicher Strukturen ist und wie leicht sie sich anwenden läßt.

Aus früher genannten Gründen [2] sind bisher vor allem mono-, bi- oder polycyclische Strukturen, d. h. Terpene und Steroide, untersucht worden, die eine Carbonylgruppe als Chromophor enthalten. Hier konnte in zahlreichen Fällen aus dem Circular dichroismus die absolute Konfiguration abgeleitet werden [3], und kürzlich gelang es auch, Konformationen aufzuklären, vor

allem durch Untersuchungen bei niedrigen Temperaturen [4]. Einzelheiten darüber finden sich in einer kürzlich erschienenen Monographie [5].

Dagegen blieben andere Funktionen als die Carbonylgruppe bisher außerhalb des Anwendungsbereiches der Methode, weil sie entweder zu kräftig oder bei zu kurzer Wellenlänge absorbieren. Einfache Moleküle ließen sich mit Hilfe indirekter Verfahren untersuchen; beispielsweise kann man einer funktionellen Gruppe einen Chromophor anfügen, dessen durch die asymmetrische Umgebung induzierter Dichroismus meßbar ist. So wurde etwa die OH-Gruppe durch die Gruppierung $-\text{ONO}$ ersetzt oder die Aminogruppe durch $-\text{N}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ [5]. Dadurch ist der Anwendungsbereich der Methode beträchtlich erweitert worden. Bei komplizierteren Molekülen, wie Polypeptiden und Proteinen, läßt sich eine Beziehung zwischen Konformation und optischer

[*] In Zusammenarbeit mit R. Viennet und M. Mansart.

[1] M. Grosjean u. M. Legrand, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 251, 2150 (1960).

[2] L. Velluz u. M. Legrand, Angew. Chem. 73, 603 (1961).

[3] R. Bucourt u. M. Legrand, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 258, 3491 (1964).

[4] G. Snatzke, D. Becher u. J. R. Bull, Tetrahedron 20, 2443 (1964).

[5] L. Velluz, M. Legrand u. M. Grosjean: Optical Circular Dichroism. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. u. Academic Press, New York-London 1965.