

Herbizide in der Photosyntheseforschung

Von Wilfried Draber, Joachim F. Kluth, Klaus Tietjen und Achim Trebst *

Professor Karl Heinz Büchel zum 60. Geburtstag gewidmet

Die Forschung auf den Gebieten der Photosynthese und der Herbizide verbindet eine lange gemeinsame Geschichte. 1956, schon bald nach der Einführung der substituierten Arylharnstoffe als hochwirksame Herbizide in die landwirtschaftliche Praxis, wurde erkannt, daß Substanzen aus dieser Verbindungsklasse den lichtabhängigen Elektronentransport und die Sauerstoffentwicklung hemmen. Seitdem werden Herbizide auch vieler anderer Stoffklassen als Photosynthesehemmer in der Forschung angewendet. Die Methoden, mit denen hier Kenntnisse über Vorgänge auf molekularer Ebene gesammelt und interpretiert wurden, sind beispielhaft dafür, wie rasch aus der allmählichen Aufklärung des Mechanismus der Photosynthese praktischer Nutzen erwachsen kann. Parallel dazu wuchs auch die Bedeutung von Herbiziden in der Photosyntheseforschung. So konnten mit ihrer Hilfe viele wichtige Details der Biochemie und Biophysik der Photosynthese geklärt werden, insbesondere die Rolle des Plastoquinons, das aus seiner Bindenische in einer der Proteinuntereinheiten des Photosystems II verdrängt wird. Auch für die aktuelle Molekularbiologie der Photosynthese erwiesen sich wieder die Herbizide als nützliche Sonden. In neuerer Zeit können mit herbizidtoleranten Mutanten Rückschlüsse auf die Struktur des Photosystems II gezogen werden. In diesem Übersichtsartikel beschreiben wir den einstigen und gegenwärtigen Stand der Wechselwirkung zwischen Photosynthese- und Herbizidforschung. Sie hat es ermöglicht, ein dreidimensionales Modell für die Orientierung von Hemmstoffen in ihrer Bindenische in den Proteinuntereinheiten des Photosystems II anzugeben.

1. Einleitung

Eine große Zahl kommerzieller Herbizide hemmt die Photosynthese^[1-4]; 1989 betrug deren Anteil am Herbizidmarkt etwa 30 %. Dieser Übersichtsartikel behandelt ausschließlich Verbindungen, die auf den Elektronentransport im Photosystem II (PS II) wirken, und damit weitaus den größten Teil dieser Herbizide. Einige typische Beispiele sind in Abbildung 1 dargestellt. Der spezifische Angriffsort dieser Verbindungen ist eine bestimmte Proteinuntereinheit im PS II, aus der reversibel gebundenes Plastoquinon (Q_b) verdrängt wird. Dieses Herbizid-Bindepotein wird auch D1-Protein genannt (Übersicht siehe^[5]) und ist, wie wir erst seit kurzem wissen, eine Untereinheit des photosynthetischen Reaktionszentrums von PS II.

Bereits sehr früh haben quantitative Messungen der Photosynthesehemmung und deren Korrelation mit physikochemischen Parametern (QSAR-Studien, QSAR = Quantitative Structure-Activity Relationship) in einigen Fällen detaillierte Beschreibungen des Einflusses bestimmter Substrukturen ermöglicht. Damit wurden aber auch bestimmte biochemische und biophysikalische Eigenschaften des Herbizid-Bindepoteins immer klarer erkennbar. Es wurde möglich, gleichsam mit Hilfe eines Negativabdruckes der für gute Photosynthesehemmung nötigen Strukturelemente die dreidimensionale Struktur der Bindenische des zunächst hypothetischen Proteins abzutasten, bevor diese selbst näher er-

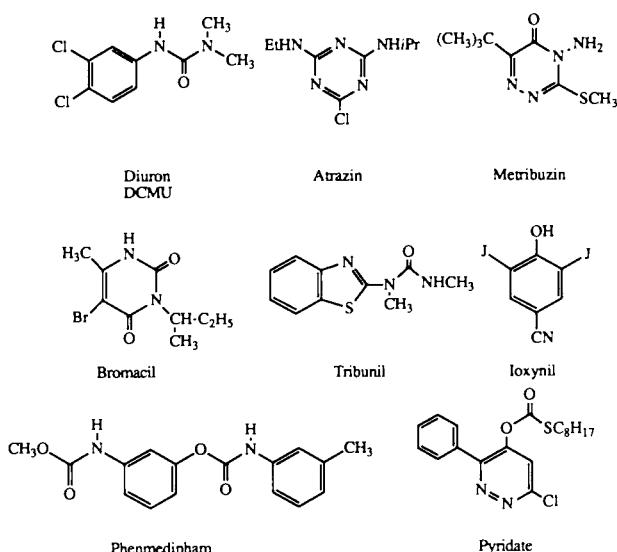


Abb. 1. Hemmstoffe des Photosystems II, die als Herbizide eingesetzt werden.

kannt wurde. So kommt es, daß die Erforschung der Biochemie und Biophysik der PS-II-Herbizide einen Stand erreicht hat, der weit über dem der meisten anderen Gebiete der Herbizidforschung liegt.

Ein entscheidender Schritt vorwärts in der Charakterisierung des Photosystems II war die Identifizierung des Herbizid-Bindepoteins. Mit radioaktiv markierten Herbiziden und über die Sequenzierung des *psbA*-Gens von herbizidtoleranten Mutanten wurde erkannt, daß das Herbizid-Bindepotein eine der Untereinheiten des PS II ist. Es ist jetzt möglich, die Bindung eines Herbizids durch Wechselwirkung mit spezifischen Aminosäuren in der Bindenische zu diskutieren. Dies wurde erst möglich durch die Kristallstrukturanalyse eines bakteriellen Photosystems^[6-8]. Ein vertieftes Ver-

[*] Prof. Dr. A. Trebst
Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen
Ruhr-Universität
Postfach 102148, W-4630 Bochum 1
Dr. W. Draber, Dr. J. F. Kluth, Dr. K. Tietjen
Bayer AG
Sektor Landwirtschaft
Chemische Forschung
Bayerwerk, W-5090 Leverkusen

ständnis der Struktur des PS II und der Homologie mit dem Photosystem der Purpurbakterien^[9] wären kaum möglich gewesen ohne den ständigen, gezielten Einsatz von Hemmstoffen und Herbiziden.

2. Der Elektronentransport im photosynthetischen Reaktionszentrum

Bei Belichtung oxidiert das PS II Wasser zu Sauerstoff und reduziert Plastochinon (PQ) zu Plasto- hydrochinon (PQH₂) (Übersichten siehe^[10, 11]). Mehrere Elektronencarrier werden für diese komplexe Reaktionsfolge benötigt. Das Reaktionszentrum (RC) des PS II enthält Chlorophyll a, vermutlich

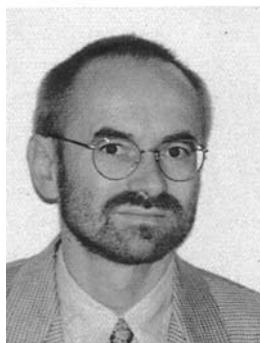
als ein Dimer, das nach seinem Absorptionsmaximum bei 680 nm P680 genannt wird. Dieses ist über zwei Histidin-Einheiten (His 198) mit den zwei homologen Polypeptiden D1 und D2, die etwa 32 kDa groß sind, verbunden. Bei Lichtanregung des P680 im Reaktionszentrum tritt eine Ladungstrennung ein, und innerhalb von zehn Picosekunden wird das Elektron von dem angeregten primären Elektronendonator P680* auf den primären Elektronenacceptor übertragen, der ein an das D1-Protein gebundenes Phäophytin ist. Das Phäophytin wiederum reduziert innerhalb etwa einer Nanosekunde das erste Plastochinon des Elektronentransportsystems, das Q_A. Das fest an das D2-Protein gebundene Q_A wird zum Semichinon reduziert. Dieses Semichinon (Radikal anion Q_A⁻) reduziert das zweite, mit dem D1-Protein



Achim Trebst, geboren 1929 in Zeitz, studierte Chemie und promovierte 1955 bei F. Weygand und A. Wacker an der Universität Heidelberg. Nach kurzer Zeit an der TU Berlin war er vier Jahre bei D. I. Arnon in Berkeley, Kalifornien, und wurde dort in die Biochemie der Photosynthese und der isolierten Chloroplasten eingeführt. Nach seiner Rückkehr zu F. Weygand habilitierte er sich 1962 für Biochemie und der TU München. 1963 wurde er außerordentlicher Professor für Biochemie der Pflanzen an der Universität Göttingen und baute ab 1967 den Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen an der neu gegründeten Universität Bochum auf. Einen Ruf an die KFA Jülich lehnte er ab. Er ist Mitglied der Leopoldina und der Rheinisch-Westfälischen Akademie, Ehrendoktor der Universität Stockholm und der Purdue University und E.- und J.-Michael-Professor im Weizmann Institut in Rehovot. Sein Arbeitsgebiet ist die Biochemie der Photosynthese, insbesondere des photosynthetischen Elektronentransportsystems und der Photophosphorylierung in der Thylakoid-Membran der Chloroplasten.



Wilfried Dräger, geboren 1929 in Schneidemühl, damals Grenzmark-Posen-Westpreußen, studierte in Kiel und Freiburg, wo er bei K. Wallenfels 1960 promovierte. Danach trat er in die Shell-Grundlagenforschung in Birminghoven ein, woran sich ein längerer Aufenthalt im Agricultural Research Centre der Shell in Sittingbourne anschloß. Seit Ende 1966 arbeitet er in der Pflanzenschutzforschung der Bayer AG. Sein besonderes Interesse gilt den quantitativen Beziehungen zwischen chemischer Struktur und biologischer Aktivität.



Klaus Tietjen, geboren 1951 in Cuxhaven, studierte Chemie in Freiburg. Nach dem Diplom (1977) arbeitete er anderthalb Jahre in der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg mit Immunoassays und promovierte 1982 im Biologischen Institut der Universität Freiburg bei U. Matern über ein phytopathologisches Thema. Diese Arbeiten setzte er als Postdoktorand fort. Seit 1984 ist er Laborleiter für Biochemie der Herbizide und Insektizide in der Chemischen Forschung des Pflanzenschutzzentrums Monheim der Bayer AG.



Joachim Friedrich Kluth, geboren 1950 in Köln, studierte Chemie in Köln. Nach dem Diplom (1975) wechselte er zum Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim/Ruhr. Er promovierte 1980 an der Universität Essen bei P. Heimbach. Die in seiner Dissertation „Steuerung homogener Übergangsmetall-Katalysen“ begonnenen Arbeiten setzte er als Hochschulassistent fort. Seit 1982 ist er in der Chemischen Forschung des Pflanzenschutzzentrums Monheim der Bayer AG tätig.

verknüpfte Plastochinon Q_B . Es ist die Reduktion von Q_B , die durch die Herbizide gehemmt wird.

Das oxidierte P680 wird durch den Mangankomplex des sauerstoffentwickelnden Systems über ein Tyrosin-161-Radikal, das in einer hydrophoben Tasche von D1 stabilisiert vorliegt^[12], rückreduziert.

Die primäre Ladungstrennung im PS II findet quer durch die innere Thylakoid-Membran statt, also im inneren Raum des Thylakoid-Vesikels. Das P680 des Reaktionszentrums liegt in der Nähe der inneren Lumen-Seite der Thylakoid-Membran. Die Plastoquinone (Q_A und Q_B), die reduziert werden, sind in der Thylakoid-Membran zur Matrix-Seite des Chloroplasten hin orientiert, d. h. ein durch die Oxidation des P680 gebildetes Elektron muß eine Strecke von etwa 30 Å zurücklegen. Dadurch wird eine Rekombination der Ladungen im Reaktionszentrum verlangsamt und eine Rückreduktion des oxidierten P680 durch den wasserspaltenden Mangankomplex ermöglicht. Dies ist in Abbildung 2 dargestellt. Das Ergebnis der lichtangeregten Ladungstrennung ist also eine Redoxreaktion quer durch die Membran und die Erzeugung eines stärker elektronegativen Reduktionsäquivalents, des reduzierten Chinons, aus dem elektropositiven Elektronendonator Wasser.

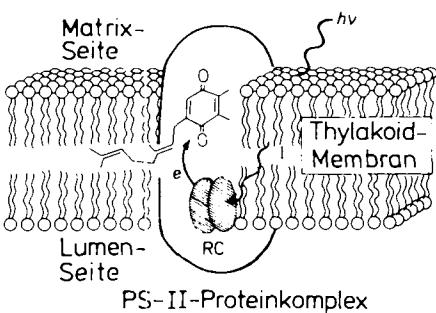


Abb. 2. Die durch Licht ausgelöste Reduktion von Chimon im Photosystem II. Ein integraler Proteinkomplex ist so in die Thylakoid-Membran eingebettet, daß er das Reaktionszentrum des PS II nach der Lumen-Seite der Membran orientiert. Bei Anregung durch Licht gibt ein Chlorophylldimer (P680) ein Elektron ab zur Reduktion des PlastoChimon, das auf der anderen Seite der Membran liegt. Herbizide verdrängen dieses Chimon.

In einem zweiten Anregungscyclus, der dem ersten gleicht, nimmt Q_B ein zweites Elektron auf und wird zum Hydrochinon reduziert. Das Plasto hydrochinon verlässt die Bindenische und setzt sich mit dem größeren, freien Plastochinon/-hydrochinon-Pool ins Gleichgewicht. Gleichzeitig besetzt ein anderes Plastochinonmolekül die Bindenische und wird zu einem neuen Q_B . Der Cyclus wird so fortgesetzt. Zwei weitere Anregungscyclen des P 680, im ganzen also vier Quanten, werden gebraucht, um den Mangankomplex, der vier Manganatome enthält, so zu oxidieren, daß aus zwei Wassermolekülen ein Sauerstoffmolekül gebildet werden kann (Abb. 3).

Die Gesamtreaktion im PS II führt somit zu zwei stabilen Endprodukten: Plastoxygen und Sauerstoff [Gl. (a)].

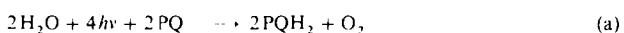


Abbildung 3 zeigt, daß die Protonen, die bei der Wasserspaltung freiwerden, in das innere Lumen der Thylakoid-Mem-

bran entlassen werden, während die Protonen, die zur Bildung von PQH_2 gebraucht werden, aus dem Matrixraum stammen. Auf diese Weise wird als Konsequenz aus dem vektoriellen Elektronentransport ein Protonengradient zwischen beiden Seiten der Thylakoid-Membran erzeugt.

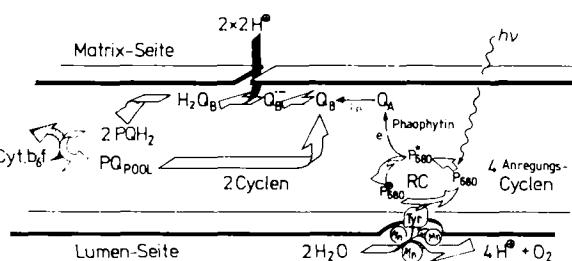


Abb. 3. Photosystem II und die Sauerstoffentwicklung. Das P680 im Reaktionszentrum des PS II reduziert Q_B zum Hydrochinon über Phäophytin und das Plastoquinon Q_A . Für die Reduktion zum Hydrochinon werden zwei Anregungscyclen gebraucht. Protonen werden aus dem Matrixraum aufgenommen. Das Plastohydrochinon verläßt seine Bindestelle im PS II und setzt sich mit dem großen Plastoquinon-hydrochinon-Pool ins Gleichgewicht. Vier Anregungscyclen durch das P680 sind nötig, um den Mangankomplex über ein Tyrosin-Radikal zu oxidiieren. Der vollständig oxidierte Mangankomplex spaltet dann zwei Moleküle H_2O , um ein Molekül O_2 zu entwickeln.

Die im PS II gebildeten Plasto-*hydro*chinonmoleküle können sich innerhalb der Membran sowohl lateral als auch transversal bewegen. Sie werden durch den Cytochrom- b_6 -f-Komplex reoxidiert, der die Elektronen dann über Plasto-cyanin (PC) auf das Photosystem I (PSI) überträgt. Die in der PQH_2 -Oxidation freigesetzten Protonen werden in das Lumen der Thylakoid-Membran abgegeben. Dadurch wird das Protonenpotential noch einmal verdoppelt. Das PS I oxidiert bei Belichtung PC und reduziert oxidiertes Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat (NADP^+) zu NADPH .

Der photosynthetische Elektronentransport führt zur Entwicklung von O_2 und stellt die Reduktionsäquivalente, die für die CO_2 -Assimilation benötigt werden, in Form von NADPH zu Verfügung. Da dies eine endergonische Reaktion ist, muß die Energie von den absorbierten Lichtquanten geliefert werden. Abbildung 4 zeigt, wie die Redoxcarrier des gesamten photosynthetischen Elektronentransportsystems in drei Proteinkomplexen PS I, PS II und dem Cytochrom- b_6 -f-Komplex gebunden sind. Jeder dieser Transmembran-Komplexe enthält in den Polypeptiduntereinheiten mehrere Carriermoleküle, die durch spezifische Bindung so orientiert sind, daß sie einen gerichteten Elektronenfluß ermöglichen. An die Transmembran-Komplexe sind periphere Proteine gebunden, die entweder wie beim wasserspaltenden System zur Lumen-Seite oder wie beim $NADP^+$ -reduzierenden System über Ferredoxin zur Matrix-Seite der Membran orientiert sind. Die großen integralen Komplexe bestehen jeweils aus mehreren hydrophoben Proteinuntereinheiten, die durch bewegliche Carriermoleküle wie Plastochinon lateral in der Membran oder wie Plastocyanin außerhalb der Membran funktionell miteinander verbunden sind. Abbildung 4 zeigt auch die Angriffsorte von drei Hemmstoffen des photosynthetischen Elektronentransports: DCMU hemmt das PS II auf Q_B -Ebene, DBMIB den Cytochrom- b_6 -f-Komplex auf der FeS-Ebene und Paraquat die $NADP^+$ -Reduktion im PS I, indem es Elektronen vom PS I abzieht.

Durch die Ausrichtung des photosynthetischen Elektronentransports in der Membran werden bei den Redoxreak-

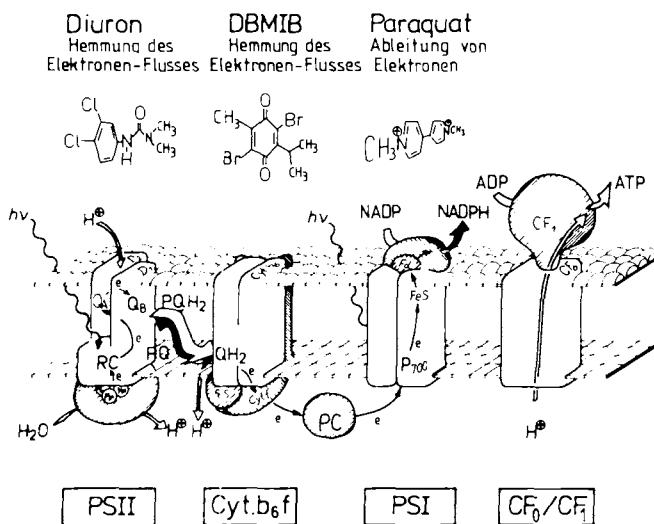
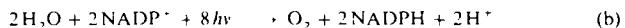
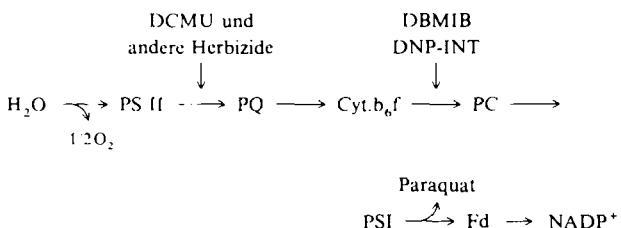


Abb. 4. Integrale Proteinkomplexe sowie typische Hemmstoffe für den Elektronentransport im photosynthetischen Reaktionszentrum und in der Photophosphorylierung. PS I, PS II und der Cytochrom- $b_{6}f$ -Komplex enthalten mehrere Elektronencarrier, die an Polypeptiduntereinheiten gebunden sind. Bewegliche Carriermoleküle wie Plastoquinon (PQ) und Plastocyanin (PC) stellen die funktionelle Verknüpfung der Komplexe her. Peripherie Polypeptide sind für die Wasserspaltung auf der Lumen-Seite des PS II und für die NADP^{+} -Reduktion über Ferredoxin (Fd) und gebundene FeS-Zentren auf der Matrix-Seite mit dem integralen Protein verbunden. Die ATP-Synthase besteht aus einem die Membran durchspannenden Protonenkanal (CF_0) und dem peripheren CF_1 -Teil. Für die Synthese von ATP wird die Freisetzung von Protonen bei der Wasserspaltung und bei der Plastoquinon-Oxidation ausgenutzt. Im PS II sind nur das Q_A -binder des Protein D2 und die Q_B -bindende Untereinheit D1 angegeben. Alle anderen Untereinheiten - auch in PS I und in anderen Komplexen - sind der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

tionen Protonen auf der Matrix-Seite der Membran aufgenommen und auf der Lumen-Seite abgegeben. Neben dem Membranpotential, das durch die beiden elektrogenen, d. h. ein elektrisches Feld aufbauenden Photosysteme erzeugt wird, entsteht so ein Protonengradient, der zur Adenosintriphosphat (ATP)-Synthese durch die ATP-Synthase verwendet wird. Das ist schematisch in Abbildung 4 gezeigt.



Gleichung (b) faßt die Bildung der Reduktionsäquivalente für die CO_2 -Assimilation (NADPH), die bei der Wasser-oxidation entstehen, zusammen. Zweimal vier Anregungscyclen in beiden Photosystemen sind nötig, um die für die Reduktion von zwei NADP- bzw. einem CO_2 -Molekül nötigen vier Elektronen zu übertragen. In Schema 1 wird eine abgekürzte Reaktionsfolge des Elektronentransports gezeigt. Die waagerechten Pfeile deuten den Elektronenfluß vom Donor zum Acceptor an, die senkrechten den Angriffs-ort einiger Hemmstoffe.



Schema 1. Fd = Ferredoxin, DNP-INT = Dinitrophenyl-iodnitrothymol, DBMIB = Dibromthymochinon, Paraquat = Methylviologen.

3. Vergleich von Struktur und Funktion des Photosystems II mit dem Photosystem von Purpurbakterien

Struktur und Funktion des sauerstoffentwickelnden PS II der Pflanzen ähneln stark dem Photosystem der Purpurbakterien^[13, 14]. Die Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse des letzteren^[6-8] war daher ein Meilenstein der Photosyntheseforschung, besonders auch im Hinblick auf das Verständnis des PS II und seiner Herbizidbindung.

3.1. Das Photosystem II der Pflanzen

Der integrale Membrankomplex, der das PS II bildet (Abb. 4), besteht aus mehr als zehn Proteinuntereinheiten^[15]. Alle mit dem Elektronentransport zusammenhängenden Vorgänge finden jedoch in prostethischen Gruppen nur zweier Polypeptide statt: D1 und D2. Sie bilden das eigentliche Reaktionszentrum des PS II. Diese beiden Proteine sind hydrophobe, integrale Polypeptide in der Thylakoid-Membran der Chloroplasten und haben ein Molekulargewicht von etwa 32 kDa. Sie enthalten die bereits erwähnten Pigmente, Redoxsysteme und andere Komponenten wie P680 (vermutlich ein Chlorophyll-a-Dimer), zwei weitere monomere Chlorophylle a, zwei Phäophytine, zwei Plastoquinone und ein durch vier Histidin-Einheiten gebundenes Eisen-Ion. Vermutlich stellen sie auch die für die Manganbindungen zuständigen Aminosäuren. Benachbart zu D1 und D2 liegen zwei weitere Proteine mit einem Molekulargewicht von 47 und 43 kDa, die etwa 30 „Antennenchlorophylle“ enthalten, welche die Anregungsenergie auf das im Reaktionszentrum befindliche P680-Chlorophyll weiterleiten.

Aus der Thylakoid-Membran angereicherte Präparationen des PS II enthalten ferner zwei Untereinheiten des Cytochrome b_{59} ^[16] und einige kleinere Proteine von unbekannter Funktion. Ein kleines Protein (4.8 kDa) bleibt stets mit hochangereichertem PS II verknüpft. Dieses ist vielleicht für eine Stabilisierung der Struktur nötig^[17]. Im *in-situ*-Komplex des PS II findet man weiterhin drei hydrophile peripherie Polypeptide, die den Mangankomplex des wasserspaltenden Systems an der D1- und D2-Untereinheit stabilisieren^[18].

Die Aminosäuresequenzen aller Untereinheiten des PS II (siehe Tabelle 1) sind bekannt aus der DNA-Sequenzierung der zugehörigen Gene. Die hydrophoben Membranproteine sind im Chloroplastengenom codiert. Die beiden Polypeptide des Reaktionszentrums D1 und D2 sind in den Genen *psbA* und *psbD* codiert, die 47- und 43-kDa-Proteine in den Genen *psbB* und *psbC*^[19]. Die drei peripheren, hydrophilen Polypeptide dagegen sind im Genom des Zellkerns codiert und werden in die Chloroplasten importiert.

Viele Details des Elektronentransports durch das PS II sind seit langem bekannt. Neuere Zusammenfassungen finden sich in^[10] und^[11]. Auch die große Ähnlichkeit der Funktionsweise des PS II und des Photosystems der Purpurbakterien wurde schon vor einiger Zeit festgestellt^[13], ebenso wie die Ähnlichkeit zwischen dem PS I und dem Reaktionszentrum bestimmter grüner Bakterien. Die Erkenntnis, daß die Aminosäuresequenzen des Reaktionszentrums von PS II und des Photosystems der Purpurbakterien weitgehend homolog sind, war ein entscheidender Durchbruch für unser Wissen um das pflanzliche Photosystem.

Tabelle 1. Proteine, Pigmente und Redoxcarrier pflanzlicher und bakterieller Photosysteme.

	PS II	Photosystem der Purpurbakterien
Polypeptide des Reaktionszentrums	D1 D2	L M
Weitere Proteine	43-kDa-Antennenprotein 47-kDa-Antennenprotein Produkte der Gene <i>pshH</i> <i>pshN</i> zwei Cytochrome b ₅₅₉ drei peripher Proteine zur Mn ₄ -Stabilisierung	H [a]
Elektronencarrier	P 680 (Chlorophyllidimer) zwei monomere Chlorophylle zwei Phäophytine zwei Plastochinone	P 870 (Bacteriochlorophyllidimer) zwei monomere Bacteriochlorophylle zwei Bacteriophäophytine zwei Ubichinone in <i>Rb. sphaer.</i> ein Ubi- und ein Mena- chinon in <i>Rps. viridis</i>
Metall-Ionen	ein Fe vier Mn Ca	ein Fe
Freisetzung von Sauerstoff	ja	nein
Elektronendonator	H ₂ O	Cytochrom c ₂

[a] In *Rps. viridis* liegt ein zusätzliches Tetrahäm-Protein vor, das in den anderen Purpurbakterien nicht vorkommt.

3.2. Das Photosystem der Purpurbakterien

Das moderne Konzept der pflanzlichen Photosynthese als wasserspaltender Reaktion beruht auf Arbeiten von *van Niel*^[20a], die dieser über die bakterielle Photosynthese schon 1941 gemacht hatte. Bakterien entwickeln zwar keinen Sauerstoff, dennoch erkannte er, daß die bakterielle Photosynthese der pflanzlichen ähnelt. Diese Hypothese stand im Gegensatz zu der von *Warburg*, der die CO₂-Spaltung in einen gebundenen Kohlenstoff (Photolyt) und Sauerstoff als primären Schritt ansah^[20b].

Später wurde deutlich, daß die Homologie des photosynthetischen Elektronentransports in Pflanzen und Bakterien sehr weit geht. Es konnte gezeigt werden, daß Carriermoleküle und Mechanismen des Elektronentransports in Purpurbakterien denen des PS II sehr ähneln^[12–14, 21]. Die Reaktionszentren des Bakteriums *Rhodobacter sphaeroides* enthalten vier Bacteriochlorophylle, darunter das Chlorophyllidimer des Reaktionszentrums P 870, zwei Bacteriophäophytine, zwei gebundene Ubichinone und ein an vier Histidin-Einheiten gebundenes Eisen-Ion^[22]. Ganz analog ist das PS II zusammengesetzt (Tabelle 1). So ist es nicht überraschend, daß die Forschungen auf beiden Gebieten sich gegenseitig stimulieren. Das Konzept von zwei gebundenen Chinonen im Reaktionszentrum wurde zuerst für ein bakterielles System bestätigt^[23]. Damit in Einklang steht, daß Terbutryn, ein hochwirksamer PS-II-Inhibitor (Formel siehe Abb. 5), auch die Chinonreduktion in Purpurbakterien hemmt^[24]; die meisten anderen Herbicide sind in Bakterien allerdings nur schwach oder gar nicht wirksam. Purpurbakterielle Photosysteme haben eine sehr viel einfachere Protein Zusammensetzung: sie bestehen aus nur drei Untereinheiten^[6, 22]. Die Redoxcarrier des Photosystems sind an zwei hydrophobe Proteine, als L und M bezeichnet, gebunden.

Hier ist zu beachten, daß auch das Reaktionszentrum des PS II aus nur zwei Proteinuntereinheiten besteht. Die DNA- und Aminosäuresequenzen für die beiden Proteine des bakteriellen Reaktionszentrums^[22, 25], die zusammen mit der H-Untereinheit den integralen Komplex bilden, zeigen eine deutliche Homologie mit den Sequenzen der D1- und D2-Proteine^[25]. Auch die Faltung der Polypeptide in beiden Systemen ist sehr ähnlich^[7, 26, 27], wie aus der Kristallstruktur des Photosystems aus *Rhodopseudomonas viridis* folgte^[6–8].

Terbutryn Hemmung des Elektronen-Flusses

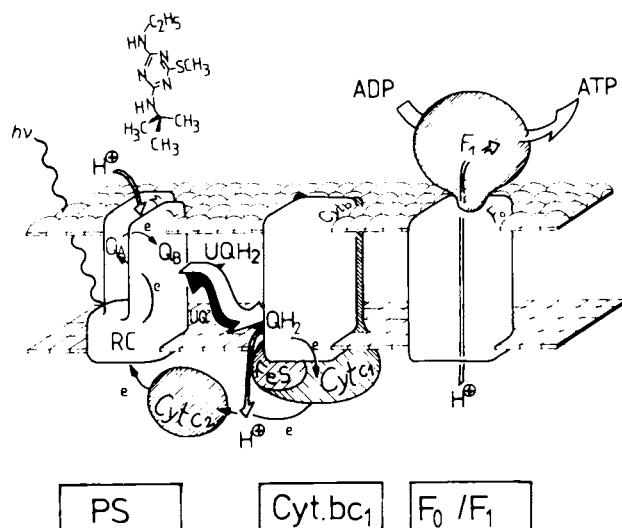


Abb. 5. Integrale Proteinkomplexe sowie ein typischer Hemmstoff im cyclischen Elektronentransport der Purpurbakterien. Der integrale Komplex des Photosystems und der Cytochrom-b-c₁-Komplex bilden ein cyclisches System, in dem Ubichinon die beiden Komplexe verbindet. Dabei werden Protonen durch die Membran gepumpt. Die ATP-Synthetase wird durch den Protonengradienten getrieben. Analog Abbildung 4 sind im Photosystem nur die L- und M-Untereinheiten angedeutet.

Der Hauptunterschied zwischen der pflanzlichen und der bakteriellen Photosynthese ist, daß Purpurbakterien keinen Sauerstoff entwickeln können. Sie oxidieren statt dessen andere organische oder anorganische Substrate zur Gewinnung der für die CO₂-Assimilation nötigen Reduktionsäquivalente. Der Elektronendonator im bakteriellen Reaktionszentrum ist nicht ein Mangankomplex, sondern Cytochrom c₂. Die Unterschiede zwischen dem pflanzlichen und dem bakteriellen Photosystem sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Gemeinsam ist der pflanzlichen und der bakteriellen Photosynthese, daß die Elektronen cyclisch um ein Photosystem geführt werden können. Die Lichtanregung des Photosystems ist die treibende Kraft für die Ladungstrennung durch die Membran und den vektoriellen Elektronentransport. Der Ubichinon-Pool, durch das bakterielle Reaktionszentrum reduziert, wird durch den Cytochrom-b-c₁-Komplex rückoxidiert. Dies ist analog der Oxidation des Plastohydrochinons durch den Cytochrome-b-c₁-f-Komplex in der Pflanze. In den Bakterien wird das in der Ladungstrennung im Photosystem abgegebene Elektron über das Cytochrome c₂ an das Reaktionszentrum zurückgegeben. Dieses Cytochrome

gleicht in seiner Funktion dem Plastocyanin, das durch das PS I zurückoxidiert wird. Die vektoriellen Redoxreaktionen erzeugen im bakteriellen System ebenfalls einen Protonengradienten, der wie in Pflanzen zur ATP-Synthese verwendet wird. Für den cyclischen Elektronentransport brauchen Bakterien nur ein Photosystem (Abb. 5). Dagegen benötigt die Erzeugung des Reduktionsmittels für die CO_2 -Assimilation (NADPH) auf Kosten von Wasser in der Pflanze zwei Photosysteme.

Durch die Kristallstrukturanalyse, zuerst von *Rhodopseudomonas viridis*^[7, 8], dann von *Rhodobacter sphaeroides*^[22], wurde gezeigt, daß das Photosystem der Purpurbakterien in jeder der beiden Polypeptide L und M fünf Transmembran-Helices enthält. Die Fixierung der prosthetischen Gruppen an diese Proteine, des Bakteriochlorophylls, der Bakteriophäophytine, des Eisens und der beiden Chinone war damit klar zu erkennen. Durch die Kristallstrukturanalyse eines Reaktionszentrums mit dem eindiffundierten Herbizid Terbutryl erhielt man Informationen über die Position dieses Inhibitors^[7, 8]. Damit war eine Extrapolation auf das PS II möglich. Dementsprechend wurde vorgeschlagen^[9, 26, 27] – und anschließend experimentell bestätigt^[16] –, daß die D1- und D2-Polypeptide das Reaktionszentrum des PS II sind. Die Basis dafür war nicht nur die mit etwa 27 % relativ geringe Homologie der Aminosäuresequenzen: Überzeugender war die gute Übereinstimmung der Faltung von L- und M-Untereinheit in Bakterien mit der aufgrund der Hydropathie-Indices^[26] vorausgesagten des pflanzlichen Systems. Es gab einige Gründe mehr für die Extrapolation vom bakteriellen auf das pflanzliche Photosystem: So sind beispielsweise die Histidin-Einheiten für die Bindung von P680 und Fe an äquivalenten Positionen im D1- und D2-Protein konserviert, wie sie für P870 und Fe in der L- und M-Untereinheit im bakteriellen Photosystem aus der Kristallstruktur erkannt wurden, wenn man die vier Aminosäuresequenzen übereinander legt.

Entscheidend für die Vorstellungen von der Faltung der Polypeptide im Reaktionszentrum des PS II^[26] waren Ergebnisse über das Verhalten von Pflanzen- und Algenmutanten gegenüber mehreren Herbiziden^[28]. Auch in Algen führt der Austausch einer bestimmten Aminosäure gegen eine andere zur Resistenz gegen das Triazin-Herbizid Terbutryl^[29].

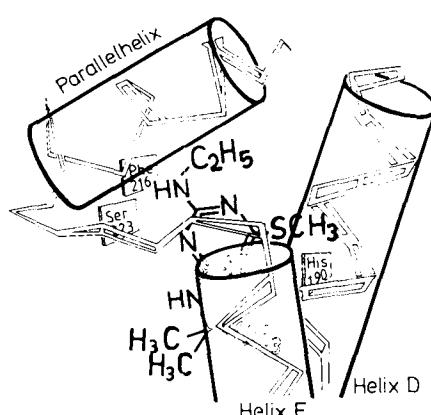


Abb. 6. Das Herbizid Terbutryl in der L-Polypeptiduntereinheit des bakteriellen Reaktionszentrums. Hier ist das Ende zweier Transmembran-Helices und eine Parallelhelix mit der Q_B - und Herbizidbindestelle des Photosystems des Purpurbakterien, entsprechend der Kristallstrukturanalyse [7] gezeigt. Vergleiche mit Abbildung 11. in der Bindung von Terbutryl in der D1-Untereinheit des PS II gezeigt ist.

Diese und andere Homologien ermöglichen es, auf die direkte Ausrichtung der Aminosäuren in der Umgebung der pflanzlichen Q_B -Bindenische zu schließen. Der Terbutryl-Bindungsort im bakteriellen Photosystem ist in Abbildung 6 dargestellt und wird in Abschnitt 8 ausführlich erörtert.

4. Photosystem II und Herbizide

Die photosynthesehemmende Wirkung von Arylharnstoffen wie Diuron (DCMU) und Triazinen wurde schon 1956 erkannt^[11], d. h. bevor die zwei Lichtreaktionen der beiden Photosysteme entdeckt wurden. Auch Plastoquinon war noch völlig unbekannt. Zunächst wußte man nur, daß die Herbizide etwas mit der Sauerstoffentwicklung zu tun hatten. Nach der Entdeckung des Plastoquinons 1959 und der beiden Photosysteme 1960 wurde erkannt, daß der Wirkungsort der Herbizide im Photosystem II liegt. Von da an war ein genaueres Studium der biochemischen und biophysikalischen Vorgänge bei der Photosynthese möglich. Die photosynthesehemmenden Herbizide waren dabei von großem Wert.

Die größte Bedeutung erlangten diese Substanzen bei der Entdeckung der beiden Chinone als primäre Elektronenacceptoren^[23, 30]. Weiterhin waren Herbizide sehr hilfreich bei der Erforschung anderer Eigenschaften des PS II, so zur Aufklärung des Weges der Lichtanregung bei variabler Antennengröße und der damit verbundenen Chlorophyllfluoreszenz und ihrer Kinetik^[31, 32].

Duyvens und *Sweers*^[31] sowie *Butler*^[32] formulierten 1962 das Konzept, daß das Verhalten des Reaktionszentrums durch einen hypothetischen „Zustand“, den sie Q oder A nannten, kontrolliert werde. Ist dieser Zustand Q reduziert, kann er kein weiteres Elektron mehr aufnehmen. Das jedoch weiterhin angeregte Photosystem muß seine Energie wieder dissipativ abgeben, was als Anstieg der Chlorophyllfluoreszenz gemessen werden kann.

Wichtig war die Beobachtung, daß Herbizide die Fluoreszenz steigern, weil sie die Reoxidation des Zustandes Q verhindern^[31]. Auf diese Weise können die Eigenschaften des Photosystems gut erfaßt werden. Der Anstieg der Fluoreszenz durch Photosyntheseinhibitoren wird heute häufig auch zur Messung der Herbizidkonzentration unter Freilandbedingungen angewendet.

Witt identifizierte zehn Jahre später den Zustand Q, also den Fluoreszenz-Quencher im PS II durch seine Absorption bei 320 nm als ein Chinon^[30]. Dieser Quencher Q wird heute Plastoquinon Q_A genannt. Die Existenz zweier gebundener Chinone im PS II, Q_A und Q_B , folgte aus ihrer Entdeckung im bakteriellen System^[23]. Es wurde klar, daß ein zweites gebundenes Chinon gebraucht wird, um die Elektronen von der Semichinon-Form Q_A^- in die stabile Plastoquinon-Form Q_B zu überführen.

Herbizide wie Diuron sind nicht nur für das Studium des PS II bedeutsam, sondern auch zur Charakterisierung des PS I. Da dieses Photosystem nicht von diesen Verbindungen gehemmt wird, läßt es sich leicht unter Bedingungen der PS-II-Hemmung untersuchen^[33]. Zwei weitere Verbindungen, die zunächst als PS-II-Herbizide konzipiert waren, DBMIB^[34] und DNP-INT^[35], erwiesen sich als sehr wirksame Inhibitoren der Reoxidation von Plastoquinon, hemmen also den Cytochrom- b_6-f -Komplex nachhaltig [siehe Abb. 4 und Gl. (a)]^[33].

DBMIB war für den Nachweis von zwei energiekonservierenden Schritten im Elektronentransport, also der Lokalisierung von zwei mit der ATP-Synthese gekoppelten Protonenpumpen durch die Membran, sehr hilfreich (Abb. 2 und 4)^[36, 37]. Weiterhin wurde eine induzierte Photophosphorylierung mit protonenübertragenden Cofaktoren erkannt^[38]. Damit wurde die Existenz eines vektoriellen Elektronenflusses durch die Membran bewiesen^[38]. Dies verhalf letztlich der chemiosmotischen Theorie von *Mitchell*, die in den siebziger Jahren im Mittelpunkt der Photosyntheseforschung stand, endgültig zur Akzeptanz. Die Verwendung von Inhibitoren – Herbiziden – hält unvermindert an; in neuester Zeit werden diese Hemmstoffe auch bei der molekularbiologischen Erforschung der Photosynthese eingesetzt. Die Anzahl der Publikationen, in denen Herbizide als gebräuchliche und vielseitige Hilfsmittel in der Photosynthese-Grundlagenforschung verwendet werden, geht in die Tausende.

5. Chemie und Biochemie der photosynthesehemmenden Herbizide

In dem gleichen Maße, wie Herbizide schon frühzeitig immer mehr zu einem wichtigen Hilfsmittel in der Grundlagenforschung wurden, haben auch Industrielaboratorien von den dabei erzielten Fortschritten profitiert. Photosynthetische Testsysteme zur schnellen Prüfung des Wirkungsmechanismus gehören mittlerweile vielerorts zur Routine. Die Inhibitorkraft, gemessen an zellfreien Systemen aus Pflanzen oder Algen und üblicherweise ausgedrückt durch den pI_{50} -Wert, den negativen Logarithmus der Herbizidkonzentration, bei der die Photosyntheseaktivität um 50 % reduziert wird, ist ein direktes Maß der primären Wirkung, nicht getrübt durch sekundäre Effekte wie Aufnahme, Translokation oder Abbau, wie sie die Prüfung mit ganzen Pflanzen mit sich bringt. Wichtig war und ist die Extrapolation von einer Stoffgruppe zur anderen, die immer mehr von vorsichtigen Tastversuchen zu rationalem Design übergeht.

Die Korrelation der an Thylakoid-Membranen gemessenen Hemmwirkung mit chemischen Deskriptoren eines Satzes von Verbindungen kann Informationen über die Anforderungen hinsichtlich der lipophilen, elektronischen und sterischen Eigenschaften innerhalb der betreffenden Verbindungsklasse liefern. Diese kann man jetzt als eine Art Negativabdruck zu einer Beschreibung der Bindenische mit ihren Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren und Hemmstoff heranziehen.

Schon 1961 hatte *Good*^[39] vorgeschlagen, daß Herbizide über Wasserstoffbrücken mit bestimmten Peptidbindungen in der hydrophoben Tasche des Bindepoteins in Wechselwirkung treten. Dieses Konzept hat sich später bestätigt: die Wasserstoffbrücken und die dazugehörigen Aminosäuren sind jetzt identifiziert. Solche Wechselwirkungen werden in Abschnitt 8 diskutiert. Als essentielle Substruktur in den klassischen Herbiziden wird eine $X=C-NH$ -Gruppierung mit einem sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatom angesehen. Diese Substruktur findet sich in der Tat in Harnstoffen, Triazinen, Triazinonen, Carbamat, Pyridazinonen, Uracilen, Aniliden und Benzimidazolen. *Büchel* hat 1972^[40] diese Vorstellungen ausführlich diskutiert und zusammengefaßt. Klas-



Abb. 7. Die für Herbizide des klassischen Typs essentielle Substruktur (in den Formelbildern halbfett gezeichnet). Dieses Strukturelement ist notwendig für die Bindung an PS II.

sische und aktuellere Beispiele für Herbizide mit dieser Gruppierung zeigen Abbildung 1 und 7.

Hansch und *Fujita* hatten 1964 zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Struktur und biologischer Aktivität eine Methode eingeführt, die die biologische Wirkgröße in einen quantitativen Zusammenhang mit mehreren physikochemischen Parametern brachte^[41]. Diese wurden mit dem Verfahren der linearen Regression untersucht. Die Methode wurde in der Folgezeit als QSAR bekannt und auf viele pharmakologisch wirksame Verbindungen und potentielle Pflanzenschutzmittel angewendet, darunter schon frühzeitig auch auf Photosyntheseinhibitoren^[42, 43].

Die erste QSAR-Studie von Arylharnstoffen wurde von *Hansch* und *Deutsch*^[43] durchgeführt und führte zu einer Gleichung der Form (c).

$$pI_{50} = 4.183 + 1.290 \pi + 0.544 \sigma \quad (c)$$

In dieser Gleichung ist pI_{50} der einfach zu bestimmende, bereits erwähnte negative Logarithmus der Herbizidkonzentration, bei der eine Hemmung der Photosynthese von 50 % eintritt, π ist proportional dem Logarithmus des Verteilungskoeffizienten in einem Octanol/Wasser-System, und σ ist die Hammett-Konstante. Später wurden mit vielen Harnstoffen anderer Struktur und mit zahlreichen anderen Photosyntheseinhibitoren QSAR-Studien durchgeführt.

Auf dem ersten internationalen Photosynthekongress in Freudenstadt 1968 wurde über eine QSAR-Studie der kurz zuvor als Photosyntheseinhibitoren entdeckten 1,2,4-Triazinonen berichtet. Die ermittelte, relativ einfache Gleichung hatte die Form (d)^[44].

$$pI_{50} = 4.608 + 1.959 \lg P - 0.486 (\lg P)^2 \quad (d)$$

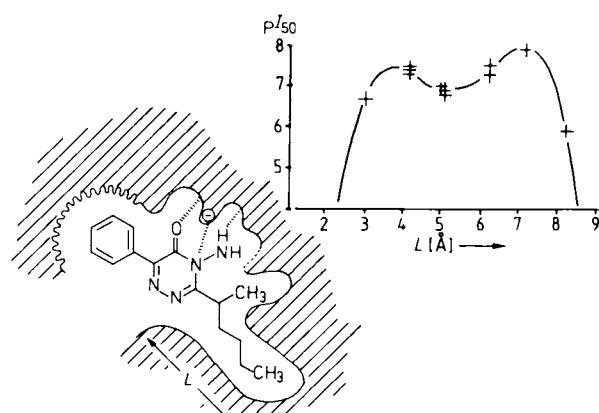


Abb. 8. Zweidimensionale Darstellung der Einbindung von Triazinonen in das Photosystem II. Die Dimensionen wurden aus einer QSAR-Studie mit Triazinonen von 1979 abgeleitet [45]. Man vergleiche sie mit der des Computermodells in Abbildung 13. Das eingefügte Diagramm zeigt die Abhängigkeit der pI_{50} -Werte von der Kettenlänge des Alkylsubstituenten der 3-Alkyl-4-amino-1,2,4-triazin-5-one.

In dieser Gleichung ist $\lg P$ der Logarithmus des Verteilungskoeffizienten zwischen Octanol und Wasser. Auf dieser Untersuchung basierte die Entwicklung des Herbizids Metamitron. In den darauffolgenden Jahren wurden weitere QSARs von Triazinonen publiziert, darunter 1979 eine^[45], aus der auf die Dimensionen der Bindenische schon relativ genau geschlossen werden konnte, was später durch Computer-Modelling bestätigt werden konnte. Abbildung 8 faßt die Ergebnisse dieser Studie zusammen.

6. Zwei Klassen von Photosystem-II-Herbiziden mit überlappenden Bindungsstellen

Die klassischen Herbizide wie Harnstoffe, Triazine und andere (Abb. 1) dominieren bis jetzt das Gebiet der PS-II-Herbizide. Eine zweite Klasse von Photosynthetheshemmern mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften rückte ab 1978 in den Mittelpunkt des Interesses^[46], darunter lange vorher bekannte Herbizide wie Dinoseb und Ioxynil^[2, 3]. Es handelt sich dabei im weitesten Sinne um Phenole, etwa wie beim Pyridate (Abb. 1), das in der Desacylform, d. h. als Phenol wirksam ist^[55].

Lange glaubte man, daß die Wirkung von Nitrophenolen auf die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung zurückzuführen sei. Sie sind jedoch wie Cyanphenole auch sehr wirksame Hemmer des photosynthetischen Elektronentransports (Abb. 9). Wie die klassischen Herbizide treten sie mit dem reversibel gebundenen Plastochinon im Photosystem II in Wechselwirkung^[47].

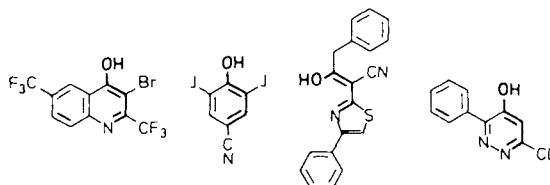


Abb. 9. Die essentielle Substruktur von Inhibitoren des Phenoltyps. Ein substituiertes Chinolin, Ioxynil, ein Ketonitril und Desacylpyridate sind dargestellt. Man vergleiche mit den klassischen Herbiziden in Abbildung 7.

Die Messung von Bindungskonstanten und die Bestimmung der gegenseitigen Verdrängung von Hemmstoffen, wie sie von *Tischer* und *Strotmann*^[48] eingeführt wurde, zeigen, daß auch Verbindungen vom Phenoltyp andere klassische Herbizide verdrängen, obwohl etwas verändert gegenüber der Verdrängung der klassischen Herbizide untereinander^[49]. Dies war Anlaß für das Konzept der überlappenden Bindungsstellen in einer gemeinsamen Bindungsdomäne^[33, 46, 50], um die Hypothese einer gemeinsamen Bindungsniche in dem gleichen Protein aufrechtzuerhalten (Abb. 10). Die PS-II-Inhibitoren vom Phenoltyp enthalten nicht die Strukturmerkmale, die für klassische Herbizide (vgl. Abb. 7) diskutiert wurden. Die QSARs zeigen eine große Abhängigkeit von sterischen Parametern, wobei die Sterimol-Parameter von *Verloop* sich als besonders brauchbar erwiesen haben^[46]. Quantenmechanische Rechnungen bestätigen beträchtliche Unterschiede der Ladungsverteilung^[51, 52], die allerdings bis jetzt in keine QSAR-Studie eingegangen sind. Außer Nitro- und Cyanphenolen gehören auch Hydroxypyridine^[53], Hy-

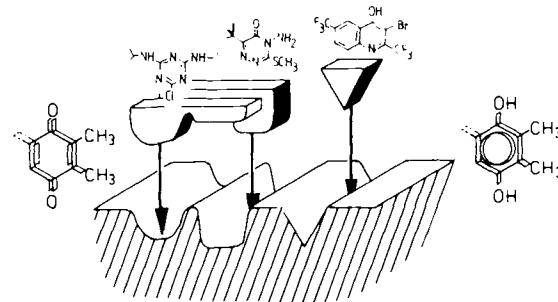


Abb. 10. Sich überlappende Bindungsstellen im Herbizidbindeprotein. Spezifische Bindungstaschen für bestimmende Substituenten in einer gemeinsamen Bindungsdomäne wurden postuliert, um die unterschiedlichen Hemmcharakteristika der beiden Plastochinon verdrängenden Herbizidfamilien zu erklären. Heute nimmt man statt dieser Modellvorstellung, die aus dem Jahre 1979 stammt, an, daß die Seitenketten der Aminosäuren in der Bindungsniche des D1-Proteins, wie in Abbildung 13 und 14 gezeigt, das Bindungsverhalten der Herbizide bestimmen.

droxychinoline^[52], Ketonitrile^[54] und das Herbizid Pyridate in seiner Desacylform^[55] zum Phenoltyp.

Vielleicht können Verbindungen dieses Typs, die sich in Entwicklung befinden, das rationale Design von Herbiziden in eine neue Richtung lenken, da sie einen veränderten Einfluß auf bestimmte regulatorische Phänomene der Photosynthese ausüben, wie in Abschnitt 8 gezeigt wird.

7. Mutationen im *psbA*-Gen (D 1-Protein) in herbizidtoleranten Pflanzen

Das Herbizid-Bindepotein D 1 wird im Chloroplastengen vom Gen *psbA* codiert, das zuerst 1982 von *Zurawski* et al.^[56] sequenziert wurde. Die erste bekannt gewordene Mutation in *Amaranthus* und *Senecio* fiel durch Toleranz gegenüber Atrazin auf. Sie wurde in Pflanzen neben häufig mit Atrazin behandelten Mais- und Weizenfeldern in den USA gefunden^[57]. In diesen Mutanten ist Serin 264 des D1-Proteins durch Glycin ersetzt^[58]. Diese Mutation trat inzwischen in einer ganzen Reihe höherer Pflanzen auf regelmäßig mit Herbiziden behandelten Flächen auf^[59]. Es handelt sich dabei jedoch um die bisher einzige Mutation, die in freier Natur gefunden wurde. In Zellkulturen höherer Pflanzen wurden auch Mutationen von Serin 264 zu Threonin^[60] und Asparagin^[61] identifiziert.

In einzelligen höheren Algen und in Cyanobakterien (niedrige blaugrüne Algen) wurden zahlreiche weitere Mutationen durch gezielte Mutagenese erzeugt^[28]. Diese Algen treiben Photosynthese wie höhere Pflanzen. Da Struktur und Funktion der jeweiligen Photosysteme gleich sind, eignen sich diese Organismen sehr gut für Untersuchungen der Photosynthese und Herbizide im Labor. Da mittlerweile sowohl Cyanobakterien^[62] wie auch einzellige höhere Algen^[63] transformiert werden können, sind beide Organismen insbesondere auch für das „Genetic Engineering“ in der Herbizidforschung nützlich.

Die Bedeutung von Mutationen im *psbA*-Gen (und des daraus resultierenden Austauschs von Aminosäuren im D1-Protein durch andere) für die Herbizidforschung liegt natürlich in der Identifizierung der an der Herbizidbindung beteiligten Aminosäuren. Weiterhin bilden die Mutanten aber auch die Grundlage für die zukünftige Entwicklung gezielter künst-

licher Herbizidresistenz von Kulturpflanzen. Bis jetzt wurden durch zielgerichtetes Screening natürlicher oder durch Mutagene induzierter Mutanten insgesamt acht zu Herbizidtoleranz führende Mutationen gefunden (Übersicht siehe^[64]). Die Mutationen betreffen die Aminosäuren Phenylalanin 211 (→ Serin), Valin 219 (→ Isoleucin), Alanin 251 (→ Valin), Phenylalanin 255 (→ Tyrosin, Leucin), Glycin 256 (→ Asparagin, Glutamat), Serin 264 (→ Glycin, Alanin, Threonin), Asparagin 266 (→ Threonin) und Leucin 275 (→ Phenylalanin). In letzter Zeit wurden durch „Site-directed“-Mutagenese, d. h. durch *in-vitro*-Manipulation der DNA und anschließende Transformation der Zielorganismen, zahlreiche weitere Aminosäuren durch andere ersetzt. Das Verhalten dieser Mutanten Herbiziden gegenüber ist noch nicht publiziert. Die Schlußfolgerungen, die sich aus Mutantenstudien für das Modelling der Proteinfaltung und der Herbizidbindung ergeben, diskutieren wir in Abschnitt 8.

Die meisten Mutanten der einzelligen höheren Alge *Chlamydomonas reinhardtii*, die aufgrund ihrer Resistenz gegenüber Metribuzin gezüchtet worden sind, oder auch natürliche Mutationen in höheren Pflanzen weisen eine Kreuzresistenz gegenüber Triazinen, Harnstoffen und anderen klassischen Herbiziden (Abb. 1) auf. Gegenüber Inhibitoren vom Phenoltyp (Abb. 9) zeigt sich dagegen nur geringe Resistenz oder sogar Supersensitivität (negative Kreuzresistenz)^[65]. Diese Mutantenstudien zeigen klar, daß die klassischen Inhibitoren und die vom Phenoltyp zwar überlappende Bindungsstellen haben, aber nicht mit allen Aminosäuren der Q_B-Bindenische den gleichen Kontakt aufweisen. Während die klassischen Herbizide anscheinend zu Serin 264 und Alanin 251 hin orientiert sind und durch deren Ersatz in Mutanten weniger wirksam werden, orientieren sich die Phenole anders und werden durch diese Mutationen nicht betroffen. Das Konzept der überlappenden Bindungsstellen^[46, 50] kann jetzt durch Computermodelle ersetzt werden, in denen die spezifischen Orientierungen der einzelnen Substanzen zu bestimmten Aminosäuren der Q_B-Bindenische definiert werden. Supersensitivität wurde für bestimmte substituierte Triazinone vorhergesagt^[67], und sie tritt selbst bei diesen klassischen Herbiziden in bestimmten *Chlamydomonas* - Mutanten tatsächlich auf^[66- 68].

8. Topologie der Herbizidbindenische im D 1-Protein

Aufgrund des Vergleichs der Aminosäuresequenz des L-Proteins der Purpurbakterien mit der des D 1-Proteins wurde dessen allgemeine Topologie erstmals 1986 vorgeschlagen^[26]. Die damals bekannten ersten fünf herbizidtoleranten Mutanten aus Pflanzen und Algen unterstützten die Faltungsannahme, da der Austausch von Aminosäuren gegen andere zu mit dem Modell konsistenten Effekten führte. Zum detaillierten Modelling wurden die mit weiteren Mutanten erzielten Daten verwendet^[65, 66, 68]. Entsprechend der Deutung der verschiedenen Kreuzresistenzmuster der beiden Herbizidfamilien als unterschiedliche Orientierung zu bestimmten Aminosäuren wurden die beiden Familien nach ihrem hypothetischen Bindungsort als Serin- und Histidinfamilie bezeichnet^[69]. Tatsächlich entsprach dies der Orientierung von zwei Inhibitoren, die im Photosystem von *Rps. viridis* durch

Kristallstrukturanalyse lokalisiert worden waren^[7, 8]. Kürzlich wurde auch die Lage von Diuron in einer Diuron-sensitiven Mutante von *Rps. viridis* aufgeklärt^[70]. In dieser Mutante weist die Carbonylgruppe des Diurons zum Histidin. Da dieses zur Serinfamilie zählende Herbizid also offensichtlich zum Histidin hin liegen kann, reicht diese Klassifizierung der beiden Herbizidsfamilien offensichtlich nicht mehr aus.

Eine weitere wertvolle Technik zur Identifizierung der an der pflanzlichen Herbizidbindenische beteiligten Aminosäuren ist die Photoaffinitätsmarkierung. Dabei werden radioaktiv markierte Azidoderivate von Inhibitoren durch Belichtung kovalent an das Protein gebunden. Mit Azidoatrazin konnte so erstmals durch Pfister, Arntzen et al. ein 32 kDa-Protein als Herbizidbindenprotein des Photosystems II identifiziert werden^[71]. Durch Proteolyse des markierten Proteins wurde Methionin 214 als Bindungsort erkannt^[72]. Oettmeier et al. sequenzierten das D 1-Protein nach Markierung mit Azidomonuron und einem Azidocyanphenol und fanden in den Tyrosin-Einheiten 237 und 254 und in Valin 246 weitere Aminosäuren der pflanzlichen Q_B-Bindenische^[73, 74].

Mit diesen Informationen konnte die Einbindung einer Reihe von Herbiziden in der Q_B-Bindenische des Reaktionszentrumsproteins des Photosystems II modelliert werden^[66, 68]. Abbildung 11 zeigt schematisch die Einbindung

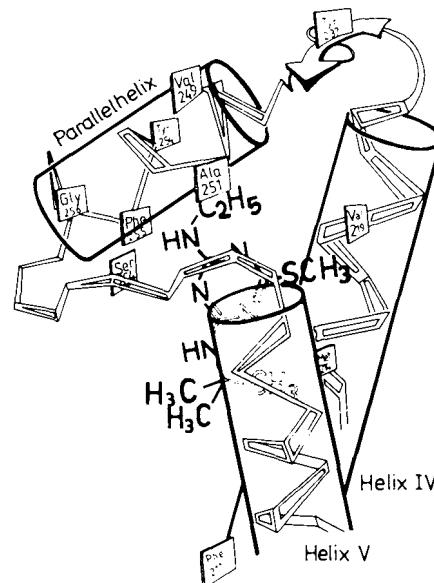


Abb. 11. Das Herbizid Terbutryn im D 1-Protein des PS II. Diese Abbildung ist analog zu Abbildung 6, mit dem Herbizid in der L-Untereinheit des Reaktionszentrums der Purpurbakterien. Die Aminosäuren wurden durch Aminosäurenaustausch in herbizidtoleranten Pflanzen (Phenylalanin 211, Valin 219, Alanin 251, Phenylalanin 255, Serin 264, Leucin 275) oder durch Photoaffinitätsmarkierung (Methionin 214, Tyrosin 237, Valin 249, Tyrosin 254) identifiziert.

von Terbutryn in das D 1-Protein des PS II, analog der Abbildung 6, in der Terbutryn in der L-Untereinheit eines bakteriellen Photosystems eingebunden ist. Abbildung 12 zeigt die Überlagerung eines Abschnittes des L-Proteins aus *Rps. viridis*^[6-8] auf den herbizidbindenden Teil des D 1-Proteins des Photosystems II: die Enden zweier Transmembran-Helices (IV und V), eine Parallelhelix und die verbindenden Sequenzen. Wie man in Abbildung 12 erkennt, enthält das D 1-Protein drei zusätzliche Aminosäuren. Die Sequenz zwischen den Aminosäuren 222 und 247 des D 1-Proteins ist

Abb. 12. Stereodarstellung des möglichen Kettenverlaufs (α -Kohlenstoffatome) des D1-Proteins [68] (grün) im Bereich der Q_h -Bindenische im Vergleich zur L-Untereinheit im bakteriellen Reaktionszentrum (purpur) [75]. Die Blickrichtung ist etwa senkrecht zur Membranebene in die Q_h -Bindenische hinein. Um das Modell mit der Struktur im bakteriellen Protein in Übereinstimmung zu bringen, wurden die Positionen von vier Aminosäureseitenketten, denen in beiden Proteinen die gleiche Bedeutung zukommt, in möglichst gute Überlagerung gebracht. Diese vier Aminosäuren sind die beiden Histidin-Einheiten 190 und 230 im Bakterium bzw. 215 und 272 in der Pflanze, Serin 223 (Bakterien) bzw. 264 (Pflanze) sowie Phenylalanin 216 (Bakterium) bzw. 255 (Pflanze). Zusätzliche Aminosäuren erweitern das D1-Protein gegenüber dem bakteriellen L-Protein: eine Aminosäure zwischen Serin 264 und der Transmembran-Helix V, die Histidin 272 trägt, zwei Aminosäuren im Loop zwischen dem Ende der kleinen Parallelhelix bei Leucin 258 und dem kleinen gestreckten Bereich bei Serin 264 sowie vierzehn Aminosäuren zwischen dem Ende der Transmembran-Helix IV, die Histidin 215 trägt, und dem Beginn der Parallelhelix. Der um die vierzehn Aminosäuren erweiterte Bereich des pflanzlichen Proteins ist hier weggelassen.

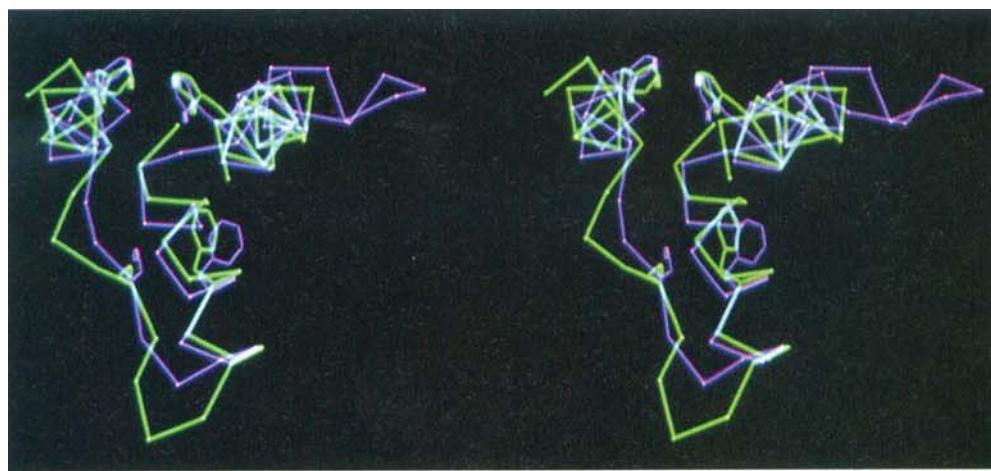


Abb. 12

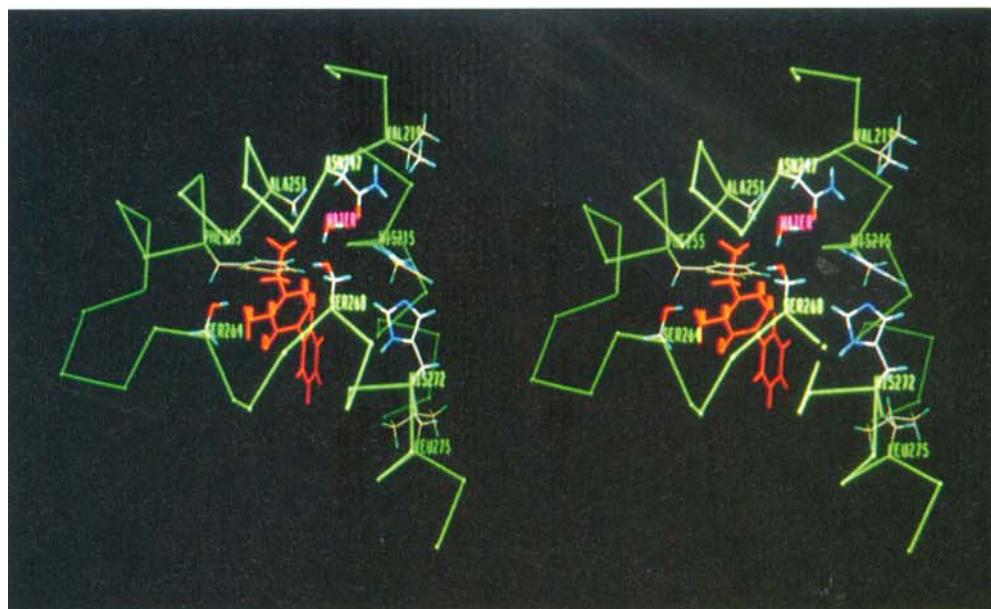


Abb. 13

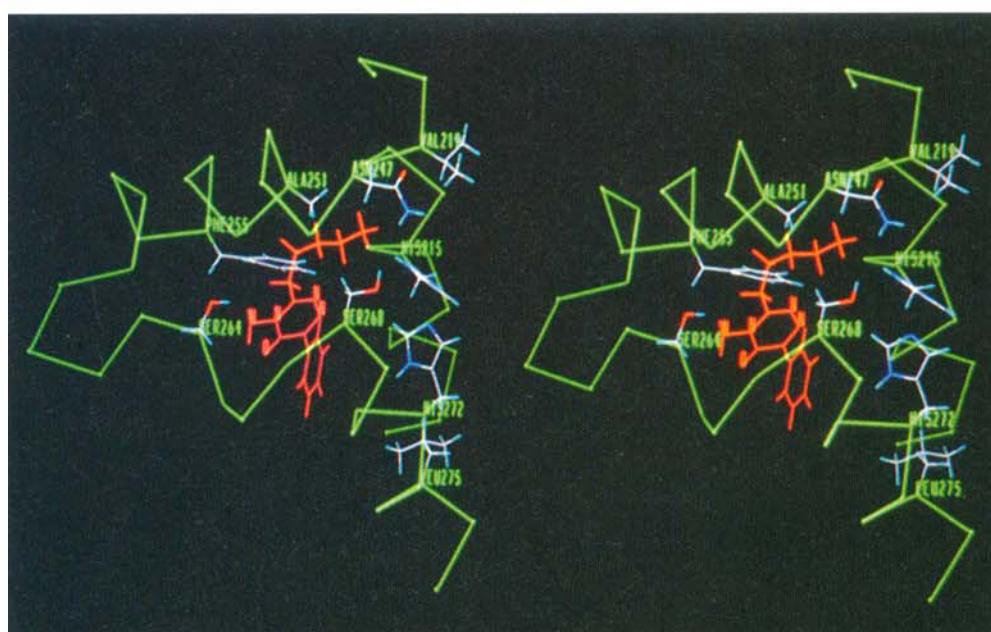
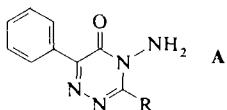


Abb. 14

wegelassen, da sie keine Homologie zum bakteriellen L-Protein aufweist; die entsprechende Sequenz des L-Proteins ragt deshalb etwas heraus. Die Rolle dieses Proteinabschnittes wird im letzten Abschnitt, der sich mit regulatorischen Phänomenen beschäftigt, diskutiert.

Um Herbizide in die Q_B -Bindenische des D1-Proteins einzudocken, verwendeten wir Kreuzresistenzdaten einer Serie von 3-Alkylderivaten des 4-Amino-6-phenyl-1,2,4-triazin-5-ons, zu der auch das in Zuckerrüben angewendete Herbizid Metamitron (Goltix[®], Nr. 2 in Tabelle 2) gehört, bei Versuchen mit fünf *Chlamydomonas-reinhardtii*-Mutanten. Die Mutationen sind Serin 264 zu Alanin, Alanin 251 zu Valin, Leucin 275 zu Phenylalanin, Phenylalanin 255 zu Tyrosin und Valin 219 zu Isoleucin. Die Lage der Mutationen in unserem Modell der Q_B -Bindenische ist in Abbildung 13 gezeigt.

Tabelle 2. Hemmwerte von sieben Triazinonen des Typs A im Wildtyp von *Chlamydomonas-reinhardtii* und mehreren Mutanten.



Nr.	R	p <i>I</i> ₅₀ im Wildtyp [a]	Resistenzfaktoren der Mutanten [b]				
			Ser 264	Ala 251	Leu 275	Phe 255	Val 219
1	H	4.0	> 1	> 1	> 1	0.5	> 1
2	Methyl	5.5	> 30	130	6.3	0.3	1.3
3	Ethyl	6.4	> 250	100	6.3	0.2	16
4	Propyl	5.2	> 16	> 16	4	0.1	1.6
5	Butyl	6.0	> 100	> 100	10	0.16	2
6	Pentyl	6.5	> 320	> 320	20	0.5	6.3
7	Hexyl	4.0	> 1	> 1	> 1	0.4	> 1

[a] pI_{50} = negativer dekadischer Logarithmus der molaren Hemmstoffkonzentration I_{50} , die zu einer Hemmung von 50 % führt. [b] Resistenzfaktor = I_{50} (Mutante): I_{50} (Wildtyp).

Die Hemmwerte von Metamitron und sechs weiteren 3-Alkyl-Triazinonderivaten sind in Tabelle 2 angegeben. In der Mutante von Serin 264 fallen die Hemmwerte fast aller Triazinone sehr stark ab. Das läßt sich als Verlust einer Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxygruppe des Serins und den Wirkstoffen deuten. Die genauere Betrachtung der räumlichen Lagemöglichkeiten läßt vermuten, daß ein Wasserstoffatom der freien Aminogruppe der Wirkstoffe eine Wasserstoffbrücke zur Hydroxygruppe des Serins aufbaut, während das Carbonylsauerstoffatom der Triazinone an einer Wasserstoffbrücke zum peptidischen Amidwasserstoffatom des dem Serin folgenden Phenylalanin 265 beteiligt ist. Der Phenylrest der Triazinone weist dann in etwa in die Richtung wie der Isoprenrest des Plastochinons. Bei der so angenommenen Grundorientierung zeigt der von uns hier variierte Rest R in die Richtung, in der Alanin 251, Serin 268 und abschließend Asparagin 247 liegen sollten (Abb. 13). Der für die Seitenkette R vorhandene Raum deckt sich sehr schön mit den Vorstellungen, die sich 1978 aus QSAR-Überlegungen ergeben hatten^[45] (vgl. Abb. 8 und 12).

Zwischen Alanin 251 und Serin 268 besteht eine Engstelle, die in der Mutante von Alanin 251 zu Valin noch schmäler wird, womit sich der starke Abfall der Hemmwerte der hier untersuchten Triazinone leicht erklären läßt (Tabelle 2). Der

Wirkungsabfall bei Verlängerung des Restes R der Triazinone zeigt, daß mit Hexyl das Ende der Bindenische erreicht wird (Abb. 13). Durch engere Faltung des Alkylrestes finden aber auch Heptyl und Octyl noch gerade Platz (Daten nicht gezeigt). Die Bindenische wird hier von der Seitenkette von Asparagin 247 begrenzt. Hinter Asparagin 247 liegt Valin 219, das die Bindenische nicht direkt berührt, dessen Mutation zum größeren Isoleucin aber dennoch durch Verschiebung der Seitenkette von Asparagin 247 die Q_B -Bindenische verkleinern und so die Hemmwerte der Triazinone herabsetzen kann.

Obwohl die Triazinone mit R gleich Wasserstoff, Methyl oder Ethyl nur bis höchstens gerade zu Ala251Val heranreichen, sind in dieser Mutante die Hemmwerte auch dieser Verbindungen unerwartet niedrig. Die Behinderung der Einbindung läßt den Schluß zu, daß sich das Protein in der Mutante nicht nur lokal an der Position 251 verändert hat; es sollte eine Verschiebung der relativen Lage der Parallelhelix (etwa Position 247 bis 258) zum Serin 264, das mit seiner Wasserstoffbrücke die Einbindungsaffinität der Triazinone dominiert, stattgefunden haben. Das Triazinon mit R gleich Propyl reicht gerade in die Engstelle zwischen Alanin 251 und Serin 268 hinein, so daß hier ein ähnlicher Verschiebungseffekt von Proteinfeldern wie in der Valin-219-Mutante zur Verringerung des Hemmwertes führen könnte. Die Verbindungen mit R gleich Butyl und Pentyl weisen wieder bessere Hemmwerte auf als die Propylverbindung. Das könnte mit einer verbesserten Raumerfüllung erklärt werden.

Wir nehmen weiterhin an, daß sich im Wildtyp-Protein zwischen den Seitenketten von Serin 268 und Asparagin 247 ein Wassermolekül befindet (vgl. Abb. 13). Das bakterielle Protein enthält an der äquivalenten Stelle tatsächlich ein Wassermolekül^[7, 75 - 77]. Die Verdrängung des Wassermoleküls aus dem D1-Protein durch die Alanin-251-Mutante oder durch die Valin-219-Mutante oder im Wildtyp durch die Bindung des Propyltriazinons könnte die beobachtete Unregelmäßigkeiten der Hemmwerte der Triazinone für sich alleine erklären (Tabelle 2). Abbildung 14 zeigt die mögliche Einbindung des Pentyltriazinons in das D1-Protein nach Verdrängung des Wassermoleküls.

Alle Verbindungen der Tabelle 2 zeigen in der Mutante Phenylalanin 255 zu Tyrosin bessere Hemmwerte als im Wildtyp. Die Phenylringe von Phenylalanin oder Tyrosin 255 und das Ringsystem der Triazinone sind wahrscheinlich sandwichartig gestapelt. Die Einführung der Hydroxygruppe in der Mutante sollte keine räumlichen Probleme aufwerfen. Da wir keine Möglichkeit zur Bildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrücke zwischen Tyrosin und Triazinonen finden, haben wir noch keine Erklärung für den Wirkungsanstieg. Aufgrund der Tatsache, daß Leucin 275 nicht direkt den Triazinonen benachbart ist, werden die Hemmwerte in der Mutante zu Phenylalanin nicht stark beeinflußt.

9. Hemmung von Regulationsphänomenen des Photosystems II durch Herbizide

Die Wirkungsweise der Photosystem-II-Herbizide wurde bis jetzt als eine kompetitive Hemmung der Q_B -Funktion im Elektronentransport des Photosystems II beschrieben. Daneben spielt jedoch ein weiterer, nicht minder bedeutsamer Effekt der Herbizide eine Rolle, der mit der Hemmung des

raschen Abbaus und Neuaufbaus (Turnover) des Herbizid-Bindeproteins in den Chloroplasten zu tun hat.

Überraschenderweise zeigt gerade das D1-Protein auch unter normalen Wachstumsbedingungen der Pflanzen einen viel schnelleren Turnover als irgendein anderes der zahlreichen an der Photosynthese beteiligten Proteine^[78, 79]. Man glaubt, daß der Turnover Teil eines Reparaturmechanismus ist^[5, 80]. Anscheinend wird das Photosystem II kontinuierlich durch überschüssige Lichtquanten in einem Photoinhibition genannten Prozeß desaktiviert^[80]. Der Mechanismus der Desaktivierung ist noch nicht geklärt, aber er scheint auf der Zerstörung von Aminosäuren oder auf einer Änderung der Faltung im D1-Protein zu beruhen. Der Schaden am D1-Protein kann nur durch Entfernung des Proteins, dessen de-novo-Synthese und Rekonstruktion des ganzen Photosystems II behoben werden.

Dieser Turnover und Reparaturmechanismus des D1-Proteins wird nun durch die meisten Inhibitoren der Q_b -Bindenische wie Atrazin oder Diuron gehemmt^[78, 79, 81], nicht aber durch bestimmte Inhibitoren vom Phenoltyp wie Bromnitrothymol oder Ketonitrile^[82, 83]. Es mag von Bedeutung sein, daß anscheinend gerade die Inhibitoren des Photosystems II, die den Turnover hemmen, auch herbizid aktiv sind, die anderen aber nicht.

Die Störung dieses regulatorischen Prozesses mag zu größeren sekundären Folgen in der Pflanze führen als nur die Hemmung - also Stillstand - des photosynthetischen Elektronenflusses allein. Man bedenke, daß Pflanzen ja auch Dunkelperioden, in denen auch kein photosynthetischer Elektronentransport stattfinden kann, gut überstehen. Durch den Eingriff in den Reparaturmechanismus durch Photosyntheseinhibitoren wird die Hemmung der Photosynthese jedoch nicht nur aufrechterhalten, sondern durch Zerstörung verschärft^[66, 83, 84]. Das könnte erklären, warum Pflanzen nach Anwendung von Photosystem-II-Herbiziden nicht einfach verkümmern, sondern unter Ausbleichen zerstört werden^[85].

Die molekularen Grundlagen für den Mechanismus der Hemmung des lichtabhängigen Abbaus des D1-Proteins durch die Herbizide werden langsam aufgeklärt. Es wird deutlich, daß einige Aminosäuren in der Q_b -Bindenische, die an sich nicht primär am Elektronentransport beteiligt zu sein scheinen, in den Photoabbau involviert sind. Die primäre Spaltungsstelle des D1-Proteins liegt in der Nähe von Glutamat 240^[86, 87]. Man vermutet, daß davor eine Erkennungssequenz („PEST-Sequenz“) für eine Protease liegt^[86]. Wie schon erwähnt, wird durch die Photoaffinitätsmarkierung mit Azidomonuron Tyrosin 237 markiert^[73], eine Aminosäure also, die sich in der Nähe der Spaltstelle befindet (Abb. 15). Man kann daher vermuten, daß die auch herbizid aktiven Hemmstoffe mit bestimmten Substituenten in den Photoabbau regulierenden Bereich des D1-Proteins hineinragen. Aus den Modellbetrachtungen der Abbildungen 11 - 14 ergibt sich, daß die Seitenkette von Tyrosin 237 in der Nähe von Asparagin 247 und Valin 219 (eine der Mutanten) Platz finden und dort mit bestimmten Herbiziden in Kontakt treten könnte. So wird verständlich, daß die Photoinhibition und der Turnover des D1-Proteins durch den Redoxzustand des Photosystems II und durch den Besetzungszustand der Q_b -Bindenische verändert werden^[80, 84]. Durch Bindung von Herbiziden in der Q_b -Bindenische könnten so für den Photoabbau notwendige konformativen Änderungen der

Spaltstelle blockiert werden. Im Bereich der Protein-Spaltstelle des „rapid turnovers“ liegt auch Arginin 238, eine Trypsin-Spaltstelle. Das Verhalten dieser Aminosäure in der Trypsinierung spiegelt das Verhalten der gesamten Aminosäuresequenz beim Photoabbau wieder, denn die Trypsinierung wird durch Herbizide wie Diuron und Atrazin verhindert, aber nicht durch solche vom Phenoltyp^[84], also ganz analog den Eigenschaften der Herbizide beim Photoabbau. Die Entdeckung der Trypsinierung des D1-Proteins liegt lange zurück und hat daher schon früh zur Auffindung des Herbizid-Bindeproteins des PS II beigetragen^[88].

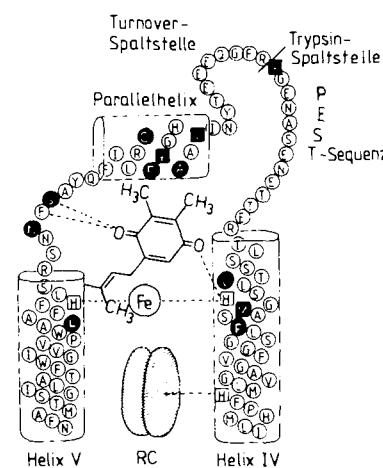


Abb. 15. Faltungsschema einer Teilsequenz des D1-Proteins, die an der Bindung von Herbiziden und dem Photoabbau beteiligt ist. Die gepunkteten Linien zeigen Wechselwirkungen von Plastoquinon-Seitengruppen mit Aminosäuregruppierungen im Q_b -Bindeprotein. Die gefüllten Kreise geben Aminosäuren an, die in Mutanten geändert sind; gefüllte Quadrate symbolisieren Aminosäuren, die durch Photoaffinitätsmarkierung gekennzeichnet wurden. Eine spezifische Trypsin-Spaltstelle erfolgt an Arginin 238 neben Tyrosin 237, an das Azidomonuron bindet. Daneben befindet sich die Spaltstelle und eine Erkennungssequenz (die PEST-Sequenz) für eine (bisher nicht identifizierte) Protease im „rapid turnover“. Das Reaktionszentrum-P680 bindet an Histidin 198 und gleichzeitig an das D2-Protein. (Um eine Übereinstimmung mit den Stereoabbildungen 12 - 14 und insbesondere mit Abbildung 6 und 11 zu erreichen, ist die Helix V vor Helix IV dargestellt).

Die Protein-Phosphorylierung könnte ebenfalls eine Rolle spielen, denn der Redoxzustand des Plastoquinon-Pools beeinflußt die Phosphorylierung einer Anzahl von Thylakoidproteinen, darunter auch die des D1-Polypeptids. Diuron hemmt die Protein-Phosphorylierung^[89], was wahrscheinlich sowohl für die Regulation des Photosystems als auch für die Wirkungsweise von Herbiziden von großer Bedeutung ist.

Die Sequenz des D1-Proteins im Bereich zwischen Arginin 225 und Asparagin 247 hat kein Äquivalent im sonst homologen L-Protein der Purpurbakterien. Entsprechend kommen in Bakterien auch weder der lichtabhängige Turnover noch die Photoinhibition vor.

Die weitere Erforschung dieser erst jetzt erkannten Wirkungsweise der Photosystem-II-Herbizide eröffnet ein neues Feld. Dieses Forschungsgebiet verspricht Einsicht in die molekulare Basis der Reaktion des photosynthetischen Elektronentransportsystems auf die rasch veränderliche Lichtintensität und die wechselnden physiologischen Bedingungen. Gleichzeitig wiederum kann eine weitere Klärung der Wirkungsweise der Photosystem-II-Herbizide auf molekularer Ebene erwartet werden.

10. Zusammenfassung und Ausblick

Das gemeinsame Ziel von Photosynthese- und Herbizidforschung, das Herbizidbindeprotein zu identifizieren und funktionell wie strukturell zu charakterisieren, ist erreicht. Überraschend stellte sich heraus, daß es eines der Reaktionszentrenpolypeptide von Photosystem II ist. Herbizid-tolerante Mutanten erwiesen sich als sehr hilfreich bei der Konstruktion eines dreidimensionalen Modells der Faltung dieses Proteins. Hemmstoffe können in das Protein einmodelliert und die an der Bindung beteiligten Aminosäuren, spezifisch für jedes einzelne Herbizid, angegeben werden. Die einzelnen Wechselwirkungen lassen sich mit Kraftfeldrechnungen näherungsweise erfassen. Die Konzeption chemisch neuer Photosynthesehemmer ist jetzt nicht mehr der limitierende Schritt in der Entwicklung eines Herbizids.

Die Kenntnis der Bindung der photosynthesehemmenden Herbizide ermöglicht es prinzipiell, durch gezielte Mutagenese in Nutzpflanzen eine Resistenz auf der Ebene der Primärwirkung einzuführen. Eine andere Frage ist die der Akzeptanz und Wirtschaftlichkeit eines solchen Vorgehens.

Die erstmals durch die Kristallstrukturanalyse von Michel, Deisenhofer und Huber erreichte Kenntnis von der dreidimensionalen Faltung eines Membranproteins hat der Photosyntheforschung einen gewaltigen Schub verliehen. Man kann sicher sein, daß das noch lange nicht ausgeschöpfte Potential der molekulargenetischen Methodik weitere ungeahnte und überraschende Einblicke eröffnen wird. Mit der Aufklärung anderer, bisher unbekannter Regulationsphänomene, die aber vermutlich mit dem Herbizidbindeprotein zusammenhängen, ergeben sich neue Ansätze für die Herbizidforschung. Die schon bekannten Eigenschaften des D1-Proteins, wie etwa der Turnover und seine Beteiligung an Proteinphosphorylierungen, aber auch die komplizierte Expressionskontrolle seines *psbA*-Gens, werden die Molekularbiologen noch lange in Atem halten. Photosynthese- und Herbizidforschung werden sicherlich ein Paradebeispiel für die Zusammenarbeit von Hochschule und Industrie bleiben.

Eingegangen am 14. Juni 1991 [A 848]

- [1] Erster Bericht: über die photosynthesehemmende Wirkung substituierter Arylharnstoffe: J. S. C. Wessels, R. van der Veen, *Biochim. Biophys. Acta* 19 (1956) 548.
- [2] C. Fedtke: *Biochemistry and Physiology of Herbicide Action*, Springer, Berlin 1982.
- [3] J. R. Corbett, K. Wright, A. C. Baillie: *The Biochemical Mode of Action of Pesticides*, Academic Press, London 1984.
- [4] D. E. Moreland, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 18 (1967) 365.
- [5] D. J. Kyle, *Photochem. Photobiol.* 41 (1985) 106.
- [6] J. Deisenhofer, H. Michel, *EMBO J.* 8 (1989) 2149.
- [7] J. Deisenhofer, H. Michel, *Angew. Chem.* 101 (1989) 872; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28 (1989) 829.
- [8] H. Michel, O. Epp, J. Deisenhofer, *EMBO J.* 5 (1986) 2445.
- [9] A. Trebst, W. Draber, *Photosynth. Res.* 10 (1989) 381.
- [10] G. Renger, *Angew. Chem.* 99 (1987) 660; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26 (1987) 643.
- [11] J. Barber, *Trends Biochem. Sci.* 12 (1987) 321.
- [12] R. J. Debus, B. A. Barry, G. T. Babcock, L. McIntosh, *Biochemistry* 27 (1988) 9071.
- [13] Übersicht: L. Zimmermann, A. W. Rutherford, *Physiol. Veg.* 23 (1985) 425.
- [14] Übersicht: M. Y. Okamura, R. J. Debus, D. Kleinfeld, G. Feher in B. L. Trumpower (Hrsg.): *Function of Quinones in Energy Conserving Systems*, Academic Press, New York 1982, S. 299.
- [15] H. Koike, M. Ikeya, T. Hiyama, K. Marama, Y. Inoue in M. Baltscheffsky (Hrsg.): *Current Research in Photosynthesis*, Vol. 1, Kluwer, Dordrecht 1989, S. 2351.
- [16] O. Nanba, K. Satoh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 109.
- [17] M. Ikeuchi, Y. Inoue, *FEBS Lett.* 241 (1988) 99.
- [18] N. Murata, M. Miyao, *Trends Biochem. Sci.* 13 (1985) 122.
- [19] J. D. Palmer, *Annu. Rev. Genet.* 19 (1985) 325.
- [20] a) C. B. van Niel, *Advan. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.* 1 (1941) 263; b) O. Warburg, *Angew. Chem.* 69 (1957) 627; engl. Fassung: *Science* 128 (1958) 68.
- [21] G. Feher, M. Y. Okamura in R. K. Clayton, W. Sistrom (Hrsg.): *The Photosynthetic Bacteria*, Plenum, New York 1978, S. 349.
- [22] J. P. Allen, G. Feher, T. O. Yeates, H. Komiya, D. C. Rees, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 5730.
- [23] C. A. Wright, *Photochem. Photobiol.* 30 (1979) 767.
- [24] R. R. Stein, A. Castellvi, J. P. Bogacz, C. A. Wright, *J. Cell. Biochem.* 24 (1984) 243.
- [25] D. C. Youvan, E. J. Bylina, M. Alberti, H. Begusch, J. E. Hearst, *Cell (Cambridge, Mass.)* 37 (1984) 949.
- [26] A. Trebst, *Z. Naturforsch. C* 41 (1986) 240.
- [27] H. Michel, J. Deisenhofer, *Biochemistry* 27 (1988) 1.
- [28] J. D. Rochaix, J. Erickson, *Trends Biochem. Sci.* 13 (1988) 56.
- [29] M. L. Paddock, J. C. Williams, S. H. Rongey, E. C. Abresch, G. Feher, M. Y. Okamura, in J. Biggins (Hrsg.): *Progress in Photosynthesis Research Vol. III*, Nijhoff, Dordrecht 1989, S. 775.
- [30] K. Witt, *FEBS Lett.* 38 (1973) 116.
- [31] L. N. M. Duysens, H. E. Sweers, *Stud. Microalgae Photosynth. Bact.* 1963, 353.
- [32] W. L. Butler, *Biochim. Biophys. Acta* 63 (1962) 309.
- [33] A. Trebst, *Methods Enzymol.* 69 (1980) 675.
- [34] A. Trebst, E. Harth, W. Draber, *Z. Naturforsch. B* 25 (1970) 1157.
- [35] A. Trebst, H. Wietoska, W. Draber, H. J. Knops, *Z. Naturforsch. C* 33 (1978) 919.
- [36] J. M. Gould, D. Ort, *Biochim. Biophys. Acta* 325 (1973) 157.
- [37] A. Trebst, S. Reimer, *Biochim. Biophys. Acta* 325 (1973) 546.
- [38] A. Trebst, G. Hauska, *Naturwissenschaften* 61 (1974) 308.
- [39] N. E. Good, *Plant Physiol.* 36 (1961) 788.
- [40] K. H. Büchel, *Pestic. Sci.* 3 (1972) 89.
- [41] C. Hansch, T. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 1616.
- [42] C. Hansch in H. Metzner (Hrsg.): *Progress in Photosynthesis Research, Vol. III*, H. Laupp, Jr., Tübingen 1969, S. 1685.
- [43] C. Hansch, E. W. Deutsch, *Biochim. Biophys. Acta* 94 (1965) 381.
- [44] W. Draber, K. H. Büchel, K. Dickoré, A. Trebst, E. Pistorius in H. Metzner (Hrsg.): *Progress in Photosynthesis Research, Vol. III* H. Laupp, Jr., Tübingen 1969, S. 1789.
- [45] W. Draber, C. Fedtke in H. Geißbühler (Hrsg.): *Advances in Pesticide Science Part 3*, Pergamon, Oxford 1979, S. 475.
- [46] A. Trebst, W. Draber in H. Geißbühler (Hrsg.): *Advances in Pesticide Science, Part 2*, Pergamon, Oxford 1979, S. 223.
- [47] W. Oettmeier, A. Trebst in Y. Inoue (Hrsg.): *The Oxygen Evolving System of Photosynthesis*, Academic Press Japan, Tokyo 1983, S. 411.
- [48] W. Tischer, H. Strotmann, *Biochim. Biophys. Acta* 460 (1977) 113.
- [49] W. Oettmeier, C. Kudc, H. J. Soll, *Pestic. Biochem. Physiol.* 27 (1987) 50.
- [50] C. J. Arntzen, C. L. Ditto, P. E. Brewer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76 (1979) 278.
- [51] A. Trebst, W. Donner, W. Draber, *Z. Naturforsch. C* 39 (1984) 405.
- [52] W. Draber, B. Pittel, A. Trebst, in P. S. Magee, D. R. Henry, J. H. Block (Hrsg.): *Probing Bioactive Mechanisms (ACS Symp. Ser.* 413 (1989) 215).
- [53] A. Trebst, B. Depka, S. M. Ridley, A. F. Hawkins, *Z. Naturforsch. C* 40 (1985) 391.
- [54] U. Bühmann, E. C. Herrmann, C. Kötter, A. Trebst, B. Depka, H. Wietoska, *Z. Naturforsch. C* 42 (1987) 704.
- [55] J. Durner, A. Thiel, P. Böger, *Z. Naturforsch. C* 41 (1986) 881.
- [56] G. Zurawski, H. J. Bohnert, P. R. Whitfield, W. Bottomley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 7699.
- [57] S. R. Radosevich, O. T. De Villiers, *Weed Sci.* 24 (1976) 229.
- [58] J. Hirschberg, L. McIntosh, *Science* 222 (1983) 1346.
- [59] J. Gressel, in S. O. Duke (Hrsg.): *Herbicide Physiology, Vol. II*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA 1985, S. 159.
- [60] F. Sato, Y. Shigematsu, Y. Yamada, *MGG, Mol. Gen. Genet.* 214 (1988) 358.
- [61] A. Páy, M. A. Smith, F. Nagy, L. Márton, *Nucl. Acids Res.* 16 (1988) 8176.
- [62] J. Hirschberg, N. Ohad, I. Pecker, A. Rahat, *Z. Naturforsch. C* 42 (1987) 758.
- [63] E. Przibilla, S. Heiss, U. Johanningmeier, A. Trebst, *Plant Cell* 3 (1991) 169.
- [64] A. Trebst in J. C. Caseley, G. W. Cussans, R. K. Atkin (Hrsg.): *Herbicide Resistance*, Butterworth-Heinemann, Oxford 1991, S. 145.
- [65] G. F. Wildner, U. Heisterkamp, A. Trebst, *Z. Naturforsch. C* 45 (1990) 1142.
- [66] A. Trebst, J. F. Kluth, K. Tietjen, W. Draber in H. Frehse (Hrsg.): *Pesticide Chemistry, Advances in International Research, Development and Legislation*, VCH, Weinheim 1991, S. 111.
- [67] W. Oettmeier, K. Masson, C. Fedtke, J. Konze, R. R. Schmidt, *Pestic. Biochem. Physiol.* 18 (1982) 357.
- [68] K. Tietjen, J. F. Kluth, R. Andree, M. Haug, M. Lindig, K. H. Müller, H. J. Wroblowsky, A. Trebst, *Pestic. Sci.* 31 (1991) 65.

- [69] A. Trebst, *Z. Naturforsch. C* 42 (1987) 742.
- [70] I. Sinning, H. Michel, P. Mathis, W. A. Rutherford, *FEBS Lett.* 256 (1989) 192.
- [71] K. Pfister, K. E. Steinback, G. Gardner, C. J. Arntzen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 981.
- [72] P. K. Wolber, M. Eilmann, K. E. Steinback, *Arch. Biochem. Biophys.* 248 (1986) 224.
- [73] R. Dostatni, H. E. Meyer, W. Oettmeier, *FEBS Lett.* 239 (1988) 207.
- [74] W. Oettmeier, K. Masson, J. Höhsfeld, H. E. Meyer, K. Pfister, H. P. Fischer, *Z. Naturforsch. C* 44 (1989) 444.
- [75] H. Michel, J. Deisenhofer, R. Huber, Eintrag in die Brookhaven Protein Data Bank unter 1PRC (1988).
- [76] M. L. Paddock, P. H. McPershon, G. Feher, M. Y. Okamura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 6803.
- [77] E. Takahashi, C. A. Wright, *Biochim. Biophys. Acta* 1020 (1990) 107-120.
- [78] A. K. Mattoo, H. Hoffmann-Falk, J. B. Marder, M. Edelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 1380.
- [79] J. B. Marder, P. Goloubinoff, M. Edelman, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 3900.
- [80] G. Schuster, R. Timberg, I. Ohad, *Europ. J. Biochem.* 177 (1988) 403.
- [81] A. K. Mattoo, J. B. Marder, M. Edelman, *Cell (Cambridge, Mass.)* 56 (1989) 241.
- [82] M. A. K. Jansen, S. Malkin, M. Edelman, *Z. Naturforsch. C* 45 (1990) 408.
- [83] A. K. Mattoo, J. B. Marder, V. Gaba, M. Edelman in G. Akoyunoglou, H. Senger (Hrsg.): *Regulation of Chloroplast Differentiation*, Vol. 2, Liss, New York 1986, S. 607.
- [84] A. Trebst, B. Depka, B. Kraft, U. Johanningmeier, *Photosynth. Res.* 8 (1988) 163.
- [85] D. E. Moreland, J. L. Hilton in L. J. Audus (Hrsg.): *Herbicides*, Vol. 1, Academic Press, London 1976, S. 493.
- [86] B. M. Greenberg, V. Gaba, A. K. Mattoo, M. Edelman, *EMBO J.* 6 (1987) 2865.
- [87] A. Trebst, B. Depka, *Z. Naturforsch. C* 45 (1990) 765.
- [88] G. Renger, *Biochim. Biophys. Acta* 440 (1976) 287.
- [89] J. Bennett, E. K. Shaw, S. Bakr, *FEBS Lett.* 210 (1987) 22.