

Über die Beziehungen zwischen Phosphathaushalt und Photosynthese III

Hemmungsanalyse der lichtabhängigen Phosphorylierung

Von OTTO KANDLER

Aus dem Botanischen Institut der Universität München

(Z. Naturforschg. 10 b, 38–46 [1955]; eingegangen am 11. Oktober 1954)

Der Einfluß verschiedener Fermentgifte auf den Glucoseeinbau durch *Chlorella* wurde in Licht und Dunkelheit untersucht. Es ergab sich, daß nur Arsenat und *o*-Phenanthrolin unter beiden Bedingungen im gleichen Umfang hemmend wirken, während Monojodessigsäure, Fluorid, Fluoressigsäure, Malonat, 2,4-Dinitrophenol, Azid, Arsenit und Cyanid im Licht erheblich weniger hemmen als im Dunkeln. Ein Zusammenhang zwischen der Stärke der Hemmung des Glucoseeinbaues und der photosynthetischen O₂-Produktion ergab sich dabei nicht.

Entsprechend früher dargelegten Überlegungen wird der vermehrte Glucoseeinbau im Licht als Indikator für eine lichtabhängige Phosphorylierung gedeutet. Die gleichmäßige Hemmung des Glucoseeinbaues in Licht und Dunkelheit durch Arsenat unterstützt diese Vorstellung. Die Möglichkeit einer Bildung energiereichen Phosphats durch den gesteigerten oxydativen Abbau von Photosynthese-Zwischenprodukten kann als Erklärung für den „Lichteinbau“ der Glucose nicht herangezogen werden, da alle Gifte, die den „Substratweg“ sperren (Monojodessigsäure, Fluorid, Fluoressigsäure, Arsenit, Malonat), den Licht-Dunkel-Unterschied vergrößern.

Auch die Bildung von \sim ph auf dem Wege der Atmungsketten-Phosphorylierung auf Grund der Rekombination des photosynthetisch erzeugten Wasserstoffes mit O₂ kann nicht der Grundmechanismus der lichtabhängigen Phosphorylierung sein, da alle Entkopplergifte (2,4-Dinitrophenol, Azid), ebenso wie die Blockierung des Cytochromsystems durch Cyanid, zu einer geringeren Hemmung der Glucoseaufnahme im Licht führen. Es ist aber durchaus möglich, daß unter normalen Bedingungen auch dieser Weg der \sim ph-Bildung neben der eigentlichen primären „Lichtphosphorylierung“ abläuft.

Nachdem nur die Blockierung der primären Photosynthese-Prozesse durch *o*-Phenanthrolin zu einer gleichmäßigen Hemmung des Glucoseeinbaues in Licht- und Dunkelheit führt, wird in Übereinstimmung mit den entsprechenden Befunden Arnons und Mitarb. angenommen, daß die Phosphorylierung unmittelbar in die Primärreaktion der Photosynthese eingeschlossen ist oder daß das Adenylsäuresystem im Gleichgewicht mit einer im Anschluß an die Lichtabsorption gebildeten Verbindung hohen Gruppenpotentials steht.

Kürzlich konnte gezeigt werden (Kandler¹), daß verarmte Chlorellen im Licht mehr Glucose einbauen als im Dunkeln. Dieser Effekt wurde durch die Annahme erklärt, daß der Glucoseeinbau im Dunkeln durch den Vorrat an Adenosintriphosphat (ATP) begrenzt ist und der Mehreinbau im Licht einen Indikator für das Abfließen von Phosphorylierungen im Zusammenhang mit der Photosynthese darstellt. Entsprechend dieser Arbeitshypothese muß es möglich sein, durch Verwendung einer Reihe von Fermentgiften mit mehr oder weniger gut bekanntem Wirkungsmechanismus eine Aussage über die Lokalisation der Phosphorylierung in der Photo-

synthese-Reaktionskette zu machen. Die Glucoseaufnahme dient dabei als Maß der Phosphorylierungs-Geschwindigkeit.

Warum es während der Photosynthese zu einem erhöhten Phosphatumsatz kommt, kann durch ganz verschiedene Annahmen erklärt werden. Im wesentlichen wurden schon in einer früheren Mitteilung (Kandler²) 3 Möglichkeiten erörtert, die auch von mehreren anderen Autoren (vgl. Pirson³, Holzer⁴, Brown und Frenkel⁵) zur Diskussion gestellt werden. In Kürze lassen sie sich vielleicht wie folgt zusammenfassen:

1. Durch den Anfall von veratembaren Photo-

¹ O. Kandler, Z. Naturforschg. 9b, 625 [1954].

² O. Kandler, Z. Naturforschg. 5b, 423 [1950].

³ A. Pirson, Fortschr. Bot. 14, 289 [1953].

⁴ H. Holzer, Angew. Chem. 66, 65 [1954].

⁵ A. H. Brown u. A. W. Frenkel, Annu. Rev. Plant Physiol. 4, 23 [1953].

synthese-Zwischenprodukten wird die Atmung während der Belichtung als Ganzes gesteigert und bewirkt damit auch vermehrte ATP-Bildung. Damit wäre die Wirkung des Lichtes auf die Phosphorylierung nur mittelbar und die Abhängigkeit derselben von der Belichtung nur scheinbar.

2. Die Reaktionsprodukte der Photolyse des Wassers rekombinieren über die Atmungsfermentkette und erzeugen dabei \sim ph. Nach dieser Vorstellung bestünde zwar eine engere Beziehung zwischen Phosphorylierung und Photosynthese, doch wäre der Mechanismus für letztere nicht spezifisch.

3. Die Aufrichtung einer energiereichen Phosphatbindung ist unmittelbar mit der Photolyse und der damit verbundenen Übertragung eines Protons auf einen geeigneten Akzeptor gekoppelt. Ein derartiger Mechanismus könnte zwar im Prinzip dem der Atmungsketten-Phosphorylierung entsprechen, benötigt aber spezifische Fermente und würde eine lichtabhängige Phosphorylierung im engeren Sinne des Wortes darstellen. Sie schließt die Möglichkeit der Rekombination und der damit verbundenen ATP-Bildung nicht aus, sondern kann dadurch noch ergänzt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zur Entscheidung der Frage, welche der 3 angeführten Möglichkeiten tatsächlich realisiert ist, zu leisten.

Material und Methodik

Algenmaterial und Kulturmethode waren dieselben wie in der vorhergehenden Mitteilung (Kandler¹). Wenn nichts anderes angegeben ist, wurden die Algen stets 24 h im Luftstrom verarmt, wobei sie in dest. Wasser suspendiert waren. Während des Versuches befanden sie sich in *m/45*-Phosphatpuffer p_H 5,7–6,0. Nur bei Verwendung von Arsenat unterblieb natürlich der Zusatz von Phosphat; für die Proben mit Cyanid wurde p_H 7,5 eingestellt, und die Kalilauge erhielt einen entsprechenden Zusatz von Cyanid.

Alle Atmungsmessungen wurden manometrisch ausgeführt. Die belichteten Proben befanden sich über einer Glühfadenlampe mit 60 cm Glühfadenlänge. Die eingestrahlte Lichtmenge betrug 2,8–3,0 μ Mol Quanten/min. Die Absorption der Algensuspension betrug über 95%, konnte jedoch während des Schüttelns nicht exakt bestimmt werden. Etwa 80% des Lichtes gehörte dem roten Spektralbereich an. Die Lichtmessungen wurden mit Hilfe des Aktinometers nach Warburg u. Mitarb.⁶ ausgeführt.

Zur übersichtlicheren Darstellung der Wirkung der verschiedenen Gifte werden im Folgenden nur Versuche mit einheitlichem Ansatz wiedergegeben. Mindestens

⁶ O. Warburg u. V. Schocken, Arch. Biochemistry **21**, 363 [1948].

3 derartige Versuche mit jeweils verschiedenen Konzentrationen des betreffenden Giftes wurden im Herbst 1953 und mindestens 2 im Frühjahr 1954 ausgeführt. Die Ergebnisse aller Parallelen waren grundsätzlich gleich, wenn auch das Ausmaß der Effekte gewissen Schwankungen unterworfen war. In den folgenden Diagrammen sind stets repräsentative Einzelversuche verwertet.

Die Versuche wurden in folgender Weise ausgeführt: Die verarmten Algen wurden in Phosphatpuffer suspendiert, mit Glucose versetzt (7 mg/ml) und davon je 3 ml in die mit 0,3 ml der 11-fach konzentrierten Giftlösung beschickten Atmungströge pipettiert. Während 3 h wurde dann manometrisch die O_2 -Aufnahme gemessen und nach dieser Zeit die Suspension entnommen, abzentrifugiert und das Überstehende auf Restglucose untersucht. Die Differenz gegenüber dem Glucosegehalt einer bei Beginn der Atmungsmessung abzentrifugierten Parallelprobe ergab die Glucoseaufnahme. Die Glucosebestimmung erfolgte nach Folin und Wu⁷.

Da sich auch in den belichteten Atmungströgen Kalilauge befand, stand für die Photosynthese nur das Atmungs- CO_2 zur Verfügung, und auch dieses wurde z. T. noch durch die Kalilauge abgefangen, so daß keine optimalen Photosynthese-Bedingungen bestanden. Günstigstenfalls konnte schwacher Druckanstieg erwartet werden, wenn man für die Photosynthese ein CO_2/O_2 -Verhältnis von 1,0 annimmt und die Atmung während des Glucoseumsatzes einen *RQ* von etwa 1,2 aufweist. Dementsprechend kommt auch die Hemmung der O_2 -Entwicklung durch die Gifte nicht voll zum Ausdruck. Ein Absinken unter den Kompensationspunkt bedeutet bereits eine sehr starke Photosynthesehemmung.

In den Diagrammen ist die O_2 -Aufnahme bzw. -Abgabe als schwarze bzw. weiße Säule dargestellt. Der Berechnung der O_2 -Abgabe lag die Voraussetzung zugrunde, daß die Dunkelatmung im Licht unbeeinflusst bleibt, wie es nach den neueren Untersuchungen Browns⁸ wahrscheinlich ist. Es muß aber noch einmal darauf hingewiesen werden, daß die Photosynthese in allen Versuchen durch den CO_2 -Mangel begrenzt war.

Der Glucoseverbrauch ist ebenfalls in Absolutwerten dargestellt. Dabei erfolgte keine Umrechnung in eingebaute und veratmete Glucose, da über die Fortdauer der Leeratmung während des Glucoseumsatzes noch keine Klarheit besteht und für die hier angeschnittenen Fragen auch die reinen Absolutwerte eindeutige Aussagen liefern.

Um die Wirkung der verschiedenen Gifte auf den Wirkungsgrad der oxydativen Assimilation darzustellen, wurde in weiteren Diagrammen der Quotient „verbrauchter O_2 /mg aufgenommener Glucose“ eingezeichnet. Eine exaktere Berechnung des „Synthetischen Wirkungsgrades“, wie sie in der vorhergehenden Mitteilung (Kandler¹) vorgenommen wurde, unterblieb, da dazu auch der *RQ* und die Beeinflussung der Leeratmung berücksichtigt werden müßten. Für die wesentlichsten Gifte werden eingehendere derartige Versuche in getrennten Mitteilungen veröffentlicht werden.

⁷ G. Folin u. H. Wu, J. biol. Chemistry **82**, 83 [1929]; **41**, 367 [1920].

⁸ A. H. Brown, Amer. J. Bot. **40**, 719 [1953].

Versuchsergebnisse

Arsenat

Bekanntlich ist Arsenat das universellste Phosphorylierungsgift (vgl. James⁹). Durch seine chemische Ähnlichkeit mit dem Phosphat ersetzt es dieses in den entsprechenden Verbindungen und verhindert somit die Bildung von \sim ph. Dabei wird der Substratabbau nicht im gleichen Ausmaß ge-

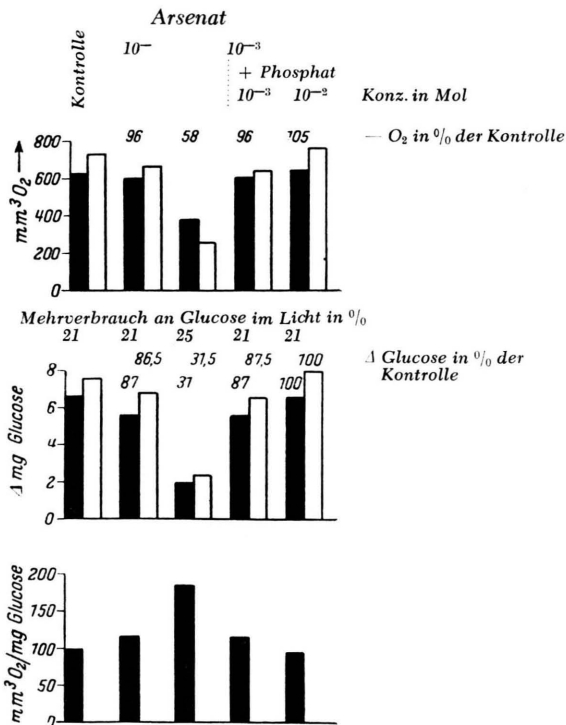


Abb. 1. Darstellung der Arsenatwirkung auf Atmung, Photosynthese und Glucoseaufnahme. Absolutwerte für je 3 ml 24 h verarmte Suspension. Versuchsdauer 3 h. $p_{\text{H}} = 6,0$; $t = 27^\circ \text{C}$. ■ Dunkelprobe. □ Hellprobe.

hemmt, so daß ein kräftiger Entkopplungseffekt auftritt. Die Arsenatwirkung auf den CO_2 -Einbau im Licht untersuchte Warburg¹⁰, der eine starke Verschlechterung der Quantenausbeute durch die Einwirkung von Arsenat fand.

Auf das hier angeschnittene Problem angewandt, kann die Arsenathemmung einen Entscheid darüber bringen, ob auch der Glucoseeinbau im Licht ebenso wie im Dunkeln ATP-abhängig ist. In diesem Falle muß die prozentuale Hemmung unter beiden Bedingungen annähernd gleich sein. Für die Frage nach der Lokalisation der Phosphorylierung im Reaktions-

⁹ W. O. James, Annu. Rev. Plant Physiol. 4, 59 [1953].

verlauf liefert die Arsenathemmung allerdings keinen Beitrag.

Abb. 1 zeigt ein typisches Versuchsergebnis. 10^{-4} -m. Arsenat hemmt die Atmung nur minimal auf 96%, während der Glucoseeinbau sowohl im Dunkeln als auch im Licht auf 87% reduziert ist. Entsprechend stärker ist diese Entkopplung bei 10^{-3} -m. Arsenat. Auch bei dieser starken Konzentration bleibt der Prozentsatz der Hemmung in Licht und Dunkelheit gleich.

Durch Phosphatzusatz kann die Hemmung sowohl der Atmung als auch des Glucoseeinbaues wieder aufgehoben werden. Auch diese Aufhebung betrifft die belichteten und verdunkelten Ansätze im gleichen Umfang. Der Glucoseeinbau reagiert also auf Arsenat-Zugabe völlig erwartungsgemäß, und es kann kein Zweifel daran sein, daß er im Licht ebenso über Phosphorylierungs-Vorgänge verläuft wie im Dunkeln.

Monojodessigsäure, Fluorid und Fluoressigsäure

Als nächstes ist die Frage zu klären, ob die gesteigerte Phosphorylierung im Licht durch eine im Licht gesteigerte Atmung hervorgerufen sein kann. Ist dies der Fall, so müssen alle, den Kohlenhydratabbau blockierenden Gifte den Glucoseeinbau im Licht und in Dunkelheit in gleichem Ausmaß hemmen.

Ein relativ spezifisches Gift der Triosephosphatdehydrase ist die Monojodessigsäure (MJ), die in höheren Konzentrationen allerdings auch andere SH-Gruppen-Fermente hemmt (vgl. James⁹). Die Wirkung auf die Photosynthese ist nur wenig untersucht, doch scheinen nach den Befunden von Holzer⁴ bemerkenswerte Effekte nach MJ-Vergiftung aufzutreten, die für einen Anstau von Phosphoglycerinsäure bei gleichzeitiger Belichtung und MJ-Vergiftung sprechen. Wie die Abb. 2 zeigt, wird jedenfalls die O_2 -Entwicklung stark gehemmt, da schon bei $5 \cdot 10^{-5}$ -m. der Kompensationspunkt nicht mehr erreicht wird.

Der Glucoseeinbau ist im Dunkeln stark gehemmt, wobei eine geringe Entkopplung auftritt, wie ebenfalls aus Abb. 2 hervorgeht. Überraschend ist die außerordentlich geringe Hemmung des Glucoseeinbaues im Licht. Eine direkte Aufhebung der MJ-Vergiftung durch Belichtung, wie sie bei der CO_2 -Vergiftung bekannt ist, kommt als Erklärung nicht

¹⁰ O. Warburg, Z. Elektrochem. angew. physik. Chem. 53, 447 [1951].

in Frage. Entsprechende Versuche mit Hefe zeigten keinerlei Unterschied in der Hemmwirkung auf den Glucoseeinbau, gleichgültig ob die Proben belichtet oder verdunkelt waren.

Wie die Kinetik der Sauerstoffaufnahme ergab, setzt die MJ-Hemmung erst nach etwa 1 h ein und erreicht allmählich ihre volle Stärke. Es war daher

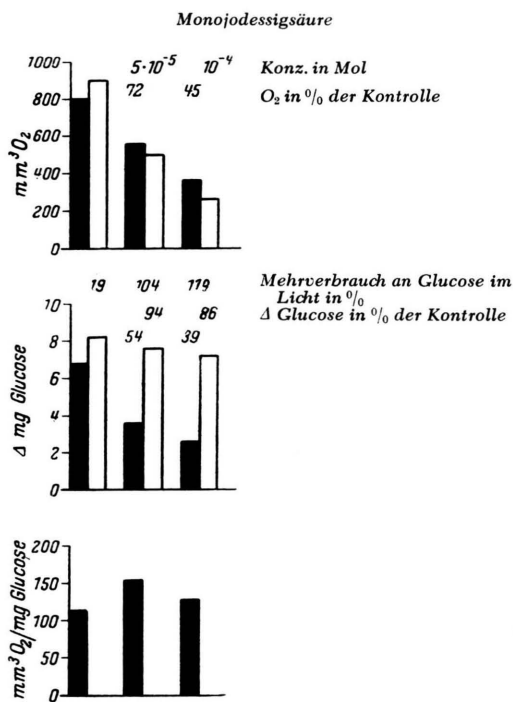


Abb. 2. Darstellung der Monojodessigsäure-Wirkung auf Atmung, Photosynthese und Glucoseaufnahme. Absolutwerte für je 3 ml 24 h verarmte Suspension. $p_H = 5,7$, $t = 27^\circ C$. ■ Dunkel-, □ Hellprobe.

notwendig, auch die Zeitabhängigkeit der Hemmung näher zu untersuchen. Dazu wurden in kleine Erlenmeyerkölbchen je 10 ml Suspension einpipettiert und je 2 belichtet bzw. verdunkelt. Ein Kölbchen jedes Ansatzes enthielt 10⁻⁴-m. MJ. In Abständen von 1 1/2 h wurden je 2 ml entnommen und die Restglucose bestimmt. Außerdem waren gleich zu Versuchsbeginn je 2 ml in Atmungströge eingebracht worden, so daß kontinuierlich am selben Material die Atmung bestimmt werden konnte. Abb. 3a gibt die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme, Abb. 3b den Glucosegehalt in 1 ml Suspension in Abhängigkeit von der Zeit wieder.

Wie bereits in der vorhergehenden Mitteilung (Kandler¹) näher erläutert, nimmt die Kontrolle innerhalb der ersten 3 h im Licht mehr Glucose auf

als im Dunkeln. Später kehren sich die Verhältnisse um. Mit MJ nimmt die Einbauhemmung im Dunkeln entspr. der immer stärker einsetzenden Atmungshemmung mit der Zeit zu, während im Licht eine weitgehende Enthemmung beobachtet werden kann.

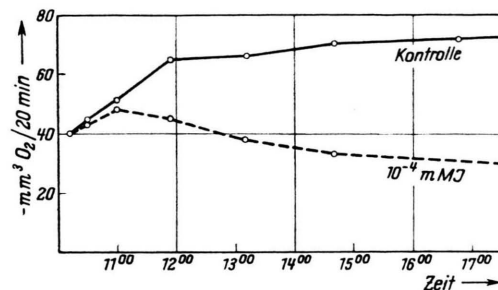


Abb. 3a. O₂-Aufnahme pro 2 ml Suspension pro 20 Minuten. $p_H = 5,7$; $t = 27^\circ C$.

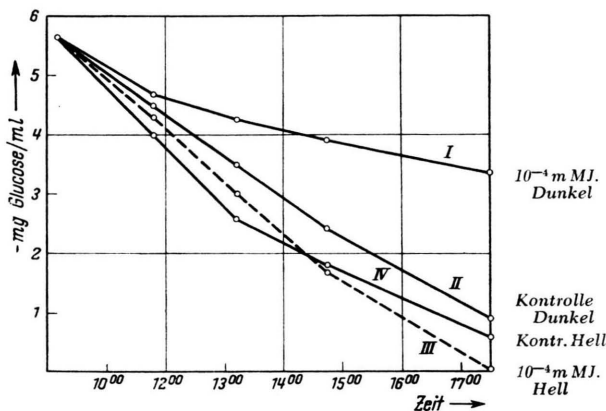


Abb. 3b. Glucoseabnahme in Abhängigkeit von der Zeit. $p_H = 5,7$; $t = 27^\circ C$.

Zunächst liegt zwar der Einbau der vergifteten Proben noch knapp unter dem Kontrollwert der Lichtprobe, während aber die Einbauleistung der belichteten Kontrolle stark absinkt, bleibt diese bei der vergifteten Probe weitgehend konstant, so daß es nach 7 h sogar zu einem absolut größeren Glucoseverbrauch der letzteren kommt.

Bei allen bisher beschriebenen Versuchen war gleichzeitig mit der Giftzugabe belichtet worden, und es wäre vorstellbar, daß das Licht lediglich das Einsetzen der Hemmung verhindert, eine bestehende Hemmung aber nicht aufheben kann. In weiteren Versuchen wurde daher so verfahren, daß einige Proben dauernd verdunkelt bzw. belichtet blieben, während andere nach verschieden langer Vorverdunklung noch 1 1/2 h belichtet wurden. Da jeweils nach

1½ h- Intervall	Kontrolle				10 ⁻⁴ -m · MJ			
	Dauer Dunkel	Dauer Licht	1½ h D 1½ h L	3 h D 1½ h L	Dauer Dunkel	Dauer Licht	1½ h D 1½ h L	3 h D 1½ h L
I	1,7	1,9	—	—	1,4	1,9	—	—
II	1,9	2,1	2,2	—	1,0	2,1	2,4	—
III	1,8	1,7	—	1,85	1,0	2,0	—	2,2

Tab. 1. Glucoseverbrauch von je 3 ml Suspension in 1½ h-Intervallen nach verschiedener Vorbehandlung. Alle Angaben in mg. $p_H = 5,7$, $t = 27^\circ C$.

1½ h aus jeder Versuchsgruppe Proben entnommen wurden, läßt sich die Glucoseaufnahme in jeweils 1½ h-Intervallen nach unterschiedlicher Vorbehandlung angeben. Tab. 1 gibt die Ergebnisse eines derartigen Versuches wieder. Sie zeigen, daß selbst nach 3 h Vorverdunklung und gleichzeitiger MJ-Einwirkung die Hemmung bei Belichtung sofort aufgehoben wird. Die Glucoseaufnahme liegt sogar in diesem Falle höher als bei entsprechender Vorbehandlung ohne Gift. Dies entspricht ganz den aus Abb. 3b ersichtlichen Befunden. Entsprechend früheren Befunden (Kandler¹) kann dieser Effekt damit erklärt werden, daß die MJ-Vergiftung den Anstau von Reservestoffen, der seinerseits den Glucoseeinbau vermindert, stark verzögert.

Zur Erklärung der Aufhebung der MJ-Hemmung des Glucoseeinbaues im Licht, trotz starker Hemmung der photosynthetischen O₂-Entwicklung, ist an die von Holzer⁴ angenommene Bildung und Wiederveratmung von Phosphoglycerinsäure (PGS) zu denken. Durch die MJ würde gewissermaßen ein Kreisprozeß erzwungen, der zur Bildung von ATP und damit auch zum Glucoseeinbau führt. Dies entspräche dem eingangs unter 1. angeführten Weg zur Bildung von ~ph während der Photosynthese.

Es ist allerdings bei Berücksichtigung der folgenden Versuche unwahrscheinlich, daß der gesamte Effekt auf diesem Mechanismus beruht. Vermutlich kommt gerade wegen der starken Atmungs- und CO₂-Einbauhemmung die lichtabhängige Phosphorylierung zur Wirkung. Wenn eine solche existiert, so wird sie jedenfalls nicht durch MJ gehemmt.

Eine Stufe tiefer als MJ greift Fluorid in den Kohlenhydratabbau ein, indem es die Enolase hemmt und damit den weiteren Abbau der PGS verhindert (Warburg¹¹, vgl. James⁹). Fluorid müßte also auf jeden Fall zu einer gleich starken Hemmung des Glucoseeinbaues in Licht und Dunkelheit führen,

¹¹ O. Warburg, Wasserstoffübertragende Fermente, Berlin 1948.

wenn die ATP-Gewinnung durch verstärkten Umsatz der PGS bewirkt wird. Wie aber Abb. 4 zeigt, wird auch durch Fluorid der „Dunkeleinbau“ erheblich

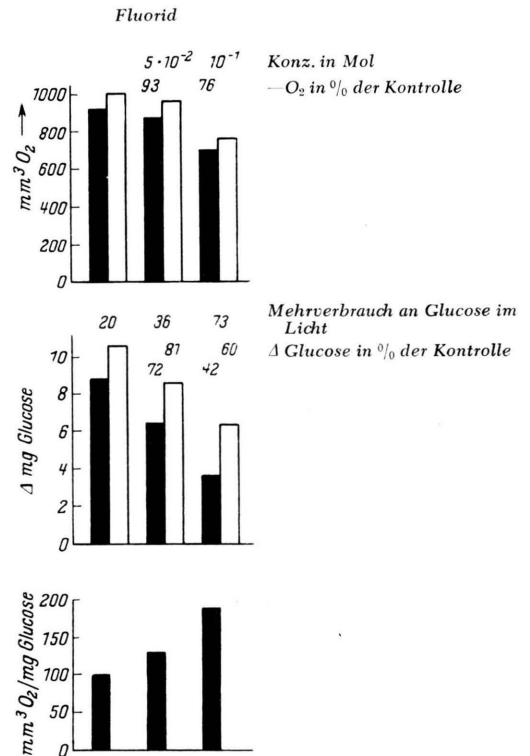


Abb. 4. Darstellung der Fluoridwirkung auf Atmung, Photosynthese und Glucoseaufnahme. Absolutwerte für je 3 ml Suspension. $p_H = 5,7$; $t = 27^\circ C$. Versuchsdauer 3 h. ■ Dunkel-, □ Hellprobe.

stärker gehemmt als der „Lichteinbau“. Allerdings ist dabei die absolute Hemmung der Glucoseaufnahme im Licht wesentlich höher als bei MJ. Aus einer Reihe von Untersuchungen ist bekannt, daß Fluorid neben der Enolasehemmung auch einige andere Fermente blockiert, so z. B. die Carboxylase (Warburg und Christiansen¹²) und in ge-

¹² O. Warburg u. W. Christiansen, Biochem. Z. 310, 384 [1941].

wissem Umfang auch die Hillreaktion (French¹³, Gorham und Clendenning¹⁴). Simonis¹⁵ fand ebenfalls eine erhebliche Hemmung der Photosynthese durch Fluorid, die er nicht nur auf die Enolasehemmung zurückführte.

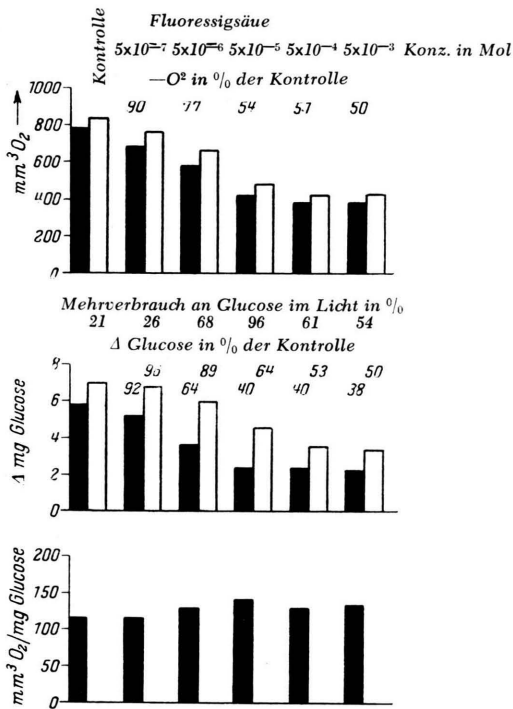


Abb. 5. Darstellung der Fluoroessigsäure-Wirkung auf Atmung, Photosynthese und Glucoseeinbau. Absolutwerte für je 3 ml Suspension. Versuchsdauer 3 h. p_H = 5,7; t = 27° C. ■ Dunkel-, □ Hellprobe.

Auch die in den eigenen Versuchen auftretende deutliche Entkoppelung der oxydativen Assimilation deutet darauf hin, daß durch Fluorid mehrere Fermente gehemmt werden, doch lassen sich darüber z. Z. keine genaueren Angaben machen. Für unsere derzeitige Betrachtung ist jedenfalls entscheidend, daß Fluorid den Glucoseeinbau im Licht relativ weniger hemmt. Dies spricht gegen eine gesteigerte Phosphorylierung durch vermehrten PGS-Umsatz im Licht.

Als typisches Gift zur Hemmung des Citronensäurecyklus gilt die Fluoroessigsäure (Elliot und Kalnitsky¹⁶, vgl. James⁹). Durch Bildung von Fluorcitronensäure wird vermutlich der weitere Abbau der Citronensäure blockiert. Über die Wirkung von Fluoroessigsäure auf die Photosynthese liegen

meines Wissens keine Arbeiten vor. Wie die Abb. 5 zeigt, wird die Atmung von *Chlorella* durch Konzentrationen von 5 · 10⁻⁷-m. bis 5 · 10⁻⁵-m. zunehmend gehemmt; stärkere Konzentrationen bewirken dagegen keine weitere Hemmung mehr. Etwa 50% der Glucoseatmung von *Chlorella* sind demnach unempfindlich gegenüber Fluoroessigsäure, und es liegt der Gedanke nahe, daß die Atmung auf andere Wege abgedrängt wird.

Über das Ausmaß der Photosynthesehemmung kann aus den eingangs erwähnten Gründen aus den in dieser Arbeit dargestellten Versuchen kein bindender Schluß gezogen werden, doch kann es sich um keine sehr starke Hemmung handeln, da auch bei den stärksten Konzentrationen der Kompensationspunkt immer noch erreicht wird.

Ganz entsprechend der Sauerstoffaufnahme wird auch der Glucoseeinbau im Dunkeln nur bis zu einer gewissen Grenze gehemmt, und alle stärkeren Konzentrationen vermögen diese Hemmung nicht mehr zu verstärken. Im Licht ist diese Einbauhemmung erheblich schwächer, nimmt aber mit steigender Konzentration länger zu als im Dunkeln. Dadurch sinkt der Licht-Dunkel-Unterschied im Glucoseeinbau wieder etwas ab. Die Entkoppelung der oxydativen Assimilation durch Fluoroessigsäure ist nur sehr gering, wie aus dem bisher bekannten Wirkungsmechanismus bereits zu schließen war. Es erscheint nach unseren bisherigen Erfahrungen über die Fluoroessigsäure-Hemmung bei *Chlorella* allerdings unwahrscheinlich, daß alle auftretenden Effekte allein durch den Eingriff an einer Stelle erklärt werden können. Eine eingehendere Darstellung dieser Beobachtungen erfolgt in anderem Zusammenhang.

Malonsäure, ein weiteres Gift des Citronensäurecyklus, führt ebenfalls zu verstärkter Hemmung des Glucoseeinbaues im Dunkeln, doch kann auf eine nähere Ausführung verzichtet werden. Zusammen mit den Ergebnissen der Fluoroessigsäure-Hemmung beweist dieser Befund erneut, daß eine Reoxydation von Photosynthese-Zwischenprodukten auf den normalen Abbauwegen als Erklärung für den vermehrten Einbau von Glucose im Licht nicht in Frage kommt.

2.4-Dinitrophenol, Azid, Arsenit

Eine weitere Möglichkeit, ATP in einer Sekundärreaktion der Photolyse zu erzeugen, besteht, wie er-

¹³ C. S. French, Annu. Rev. Biochem. 15, 397 [1946].
¹⁴ P. R. Gorham u. K. A. Clendenning, Arch. Biochem. Biophysics 37, 199 [1952].

¹⁵ W. Simonis, Z. Naturforsch. 4b, 109 [1949].
¹⁶ W. B. Elliot u. G. Kalnitsy, J. biol. Chemistry 186, 477 [1950].

wähnt, in der Rückreaktion des gebildeten H höheren Potentials mit O_2 . Gifte, die die Atmungsketten-Phosphorylierung entkoppeln, müßten in diesem Falle wiederum gleiche prozentuale Einbauhemmung in Licht und Dunkelheit bewirken. Als typisches derartiges Gift wurde zunächst 2,4-Dinitro-

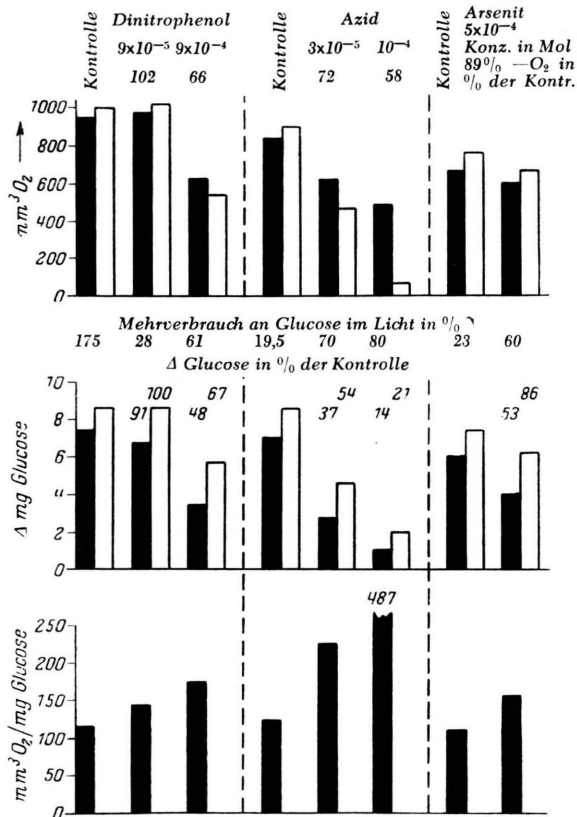


Abb. 6. Darstellung der Wirkung von 2,4-Dinitrophenol, Azid und Arsenit auf Atmung, Photosynthese und Glucoseaufnahme. Absolutwerte für je 3 ml Suspension. Versuchsdauer 3 h. $p_H = 5,7$; $t = 27^\circ C$. ■ Dunkel-, □ Hellprobe.

phenol (DNP) verwendet, das den Elektronentransport durch das Cytochromsystem ermöglichen soll, ohne daß $\sim ph$ gebildet wird (vgl. James⁹ und Anfin sen und Kielley¹⁷). Allerdings werden vermutlich auch andere Phosphorylierungen durch DNP betroffen.

Wie Abb. 6 zeigt, bewirkt eine Konzentration von 9×10^{-5} -m. DNP bei $p_H 5,7$ noch keine Hemmung der O_2 -Aufnahme (eine Atmungsförderung durch DNP wird bei *Chlorella* nur bei der Leeratmung, nicht bei der Glucoseatmung bewirkt), wohl aber eine Ver-

minderung des Glucoseverbrauchs um 10 Prozent. Dagegen tritt im Licht bei der gleichen Konzentration noch keine meßbare Verringerung der Glucoseaufnahme ein. Bei stärkeren Konzentrationen vergrößert sich die Differenz zwischen Licht- und Dunkeleinbau immer mehr, obwohl auch der Absolutbetrag für den Glucoseeinbau im Licht absinkt.

Ganz entsprechend verhält sich auch Azid (Abb. 6), das ebenfalls als Entkoppler gilt (vgl. James). Sowohl die Hemmung der Photosynthese, als auch die Entkoppelung der oxydativen Assimilation ist bei Azid erheblich extremer als bei DNP. Wiederum ist aber die relative Hemmung des Einbaues im Licht deutlich geringer als im Dunkeln. Wenn man vom Gesamtglucose-Verbrauch die veratmete Glucose in Abzug bringt, so tritt dies besonders deutlich in Erscheinung.

Diese Befunde entsprechen auch den Beobachtungen bei Arsenitvergiftung, wie ebenfalls Abb. 6 zeigt. Arsenit hemmt den oxydativen Abbau der Brenztraubensäure (vgl. James⁹), greift aber vermutlich auch in die Atmungskette ein, wie die kräftige Entkoppelung (Abb. 6, unteres Diagramm) zeigt. Wenn die eben angeführten Gifte auch den Glucoseeinbau im Licht hemmen, so ist diese Hemmung doch so sehr viel schwächer als die im Dunkeln, daß nicht angenommen werden kann, daß die lichtabhängige Phosphorylierung über die Atmungskette erfolgt.

Cyanid und *o*-Phenanthrolin

Das klassische Gift zur Blockierung des Cytochromsystems stellt seit den Arbeiten Warburgs¹⁸ das Cyanid dar. Dessen Wirkung auf den Glucoseeinbau im Dunkeln wurde bei *Chlorella* in neuerer Zeit von Syrett¹⁹ untersucht. Übereinstimmend mit dessen Ergebnissen konnte in den eigenen Versuchen ebenfalls festgestellt werden, daß auch Cyanid eine deutliche Entkoppelung der oxydativen Assimilation bewirkt, die mit zunehmender Konzentration allerdings nicht linear ansteigt (Abb. 7).

Die Hemmung der Photosynthese ging selbst bei 10^{-3} -m. Cyanid nicht so weit, daß der Kompensationspunkt unterschritten wurde. Trotz starker Hemmung des Glucoseeinbaues im Dunkeln, wurde im Licht mehr als das Doppelte an Glucose aufgenommen. Mit den Forderungen der Rekombinationstheorie ist diese Beobachtung unvereinbar. Sie unterstreicht

¹⁸ O. Warburg, Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten, Berlin 1948.

¹⁹ P. J. Syrett, Ann. Botany, N.S., 15, 473 [1951].

¹⁷ C. B. Anfin sen u. W. W. Killey, Annu. Rev. Biochem. 23, 17 [1954].

damit die Folgerungen, die aus den Versuchen mit DNP und Azid gezogen wurden.

Ebenfalls ein Schwermetall-Komplexbildner, der auch die Hillreaktion besonders stark hemmt (Arnon und Whatley²⁰), ist *o*-Phenanthrolin. Warburg¹⁸ benutzte es bei seinen Untersuchungen über isolierte Chloroplasten und nahm an, daß bei der Wasserspaltung Zink als Wirkgruppe beteiligt sei. Wie die Abb. 7 zeigt, ist *o*-Phenanthrolin ein

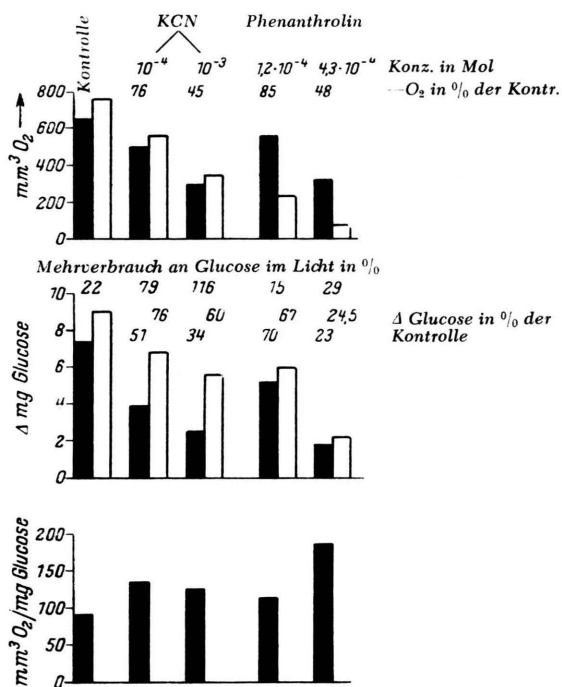


Abb. 7. Darstellung der Wirkung von Cyanid und *o*-Phenanthrolin auf Atmung, Photosynthese und Glucoseeinbau. Versuchsdauer 3 h. Absolutwerte für je 3 ml Suspension. $p_H = 7,5$; $t = 27^\circ C$. ■ Dunkel-, □ Hellprobe.

sehr starkes Photosynthesegift, führt auch zu einer deutlichen Entkoppelung der oxydativen Assimilation und hemmt den Glucoseeinbau im Dunkeln und im Licht in annähernd gleichem Ausmaß. Der Unterschied gegenüber der Cyanidwirkung ist augenfällig.

Diskussion der Ergebnisse

Die Gegenüberstellung der Befunde aus den Versuchen mit Cyanid und *o*-Phenanthrolin zeigen besonders klar, daß der Ort der lichtabhängigen Phosphorylierung bei der primären Lichtreaktion gesucht werden muß. Analog der Atmungsketten-Phosphory-

lierung könnte bereits beim Elektronentransport, der mit der Photolyse und der Aufnahme eines Protons durch einen Akzeptor verbunden sein muß, $\sim ph$ gebildet werden. Grundsätzlich muß auch daran gedacht werden, daß die unmittelbare Folge der Quantenabsorption nicht die Wasserspaltung zu sein braucht, sondern daß auch primär eine energiereiche Phosphatbindung bzw. eine Verbindung hohen Gruppenpotentials, die mit dem Adenylsäuresystem im Gleichgewicht steht, aufgerichtet werden könnte. Erst die Hydrolyse dieser Verbindung führt dann zur Wasserspaltung und zur Bildung eines hydrierten H-Akzeptors. Die bisher fruchtlose Suche nach dem primären Hydrierungsprodukt spricht durchaus für die Erwägung dieser Alternative.

Ansatzpunkte für eine derartige Arbeitshypothese ergeben sich vielleicht aus den Überlegungen, wie sie Boyer u. Mitarbb.²¹ zum Mechanismus der Atmungsketten-Phosphorylierung angestellt haben. Sie untersuchten den Austausch von ³²P zwischen anorganischem Phosphat und ATP, bzw. den von ¹⁸O zwischen anorg. Phosphat und Wasser in substratfreien Mitochondrien-Präparaten. An Stelle des erwarteten Verhältnisses 1:1 fanden sie einen 20-fach höheren Austausch von ¹⁸O gegenüber ³²P. Daraus folgerten sie, daß das in Abb. 8 dargestellte Gleichgewicht zwischen H-Akzeptor (YH) und PO₄⁻⁻⁻ einerseits, phosphoryliertem Akzeptor und Wasser andererseits bestehen muß. Es erscheint mir überlegenswert, ob nicht ähnliche Reaktionen, gewissermaßen mit Lichtenergie im Vorspann, an den primären photochemischen Vorgängen beteiligt sein könnten.

Nach Abschluß vorliegender Arbeit erschien eine vorläufige Mitteilung von Arnon u. Mitarbb.²², in der sie bekanntgeben, daß es ihnen gelang, an isolierten Chloroplasten den Einbau von markiertem PO₄⁻⁻⁻ bei Belichtung zu messen. So verschieden die Versuchsanstellungen dieser und der hier berichteten Untersuchungen auf den ersten Blick auch erscheinen mögen, so gehen sie doch auf die gleiche Grundvorstellung zurück und führten auch zu den gleichen Ergebnissen. Arnon u. Mitarbb.²² gaben in ihre Versuchsansätze neben Chloroplasten und markiertem Phosphat auch noch Glucose, Hexokinase und AMP, um so das entstehende $\sim ph$ abzufangen und in Glucosephosphat festzulegen. Gemessen

²¹ P. D. Boyer, A. B. Falcone u. W. H. Harrison, Nature [London] 174, 401 [1954].

²² D. J. Arnon, M. B. Allen u. F. R. Whatley, Nature [London] 174, 394 [1954].

²⁰ D. J. Arnon u. F. R. Whatley, Arch. Biochem. Biophysics 23, 141 [1949].

wurde der Einbau an markiertem Phosphat. Praktisch wurde in den eigenen Versuchen die gleiche Reaktionsfolge erfaßt, nur daß als Maß nicht der Phosphateinbau, sondern die aufgenommene Glucose benützt wurde.

Die Verwendung einiger Gifte ergab gute Übereinstimmung mit den eigenen Versuchen. Jodacetamid hemmte den CO_2 -Einbau, aber nicht die Phosphorylierung und die Photolyse. DNP hemmte den CO_2 -Einbau stark, die Phosphorylierung weniger und die Photolyse kaum. Phenanthrolin führte zur Hemmung aller 3 Reaktionen. Eine Diskrepanz gegenüber den eigenen Versuchen besteht nur darin, daß Arnon u. Mitarbb.²² unter anaeroben Bedingungen eine sehr starke Hemmung der Lichtphosphorylierung fanden, während in den früher mitgeteilten Befunden, die an Chlorellen gewonnen worden waren, keine derartige Hemmung gefunden werden konnte (Kandler¹). Diese Differenz mag aber doch auf den sehr unterschiedlichen Versuchsbedingungen beruhen. Auf Grund einiger weiterer Befunde kommen Arnon u. Mitarbb.²² zu dem Schluß, daß die lichtabhängige Phosphorylierung mit der primären Photoreaktion unmittelbar verknüpft sein muß.

So überzeugend auch die Versuche Arnons u. Mitarbb.²² für diese Anschauung sprechen, so werden sicherlich dagegen die gleichen Einwände erhoben werden wie gegen die von Vishniak und Ochoa²³ experimentell gefundene Möglichkeit einer $\sim\text{ph}$ -Bildung auf dem Wege der Rekombination: daß diese Reaktionen nur in einem künstlich zusammengestellten System *in vitro* ablaufen und nichts mit der Photosynthese *in vivo* zu tun haben (vgl. Brown und Frenkel⁵, Holzer⁴, Pirsone³). Dieser Einwand wird durch die eigenen Versuche weitgehend entkräftet, da dabei ganze, lebende Zellen verwendet wurden, ohne Zusatz irgendwelcher Fermente oder Redoxsysteme. Lediglich der sicherlich nicht unphysiologische Kunstgriff der Verarmung wurde angewendet, um den vermehrten Glucoseeinbau im Licht und damit die lichtabhängige Phosphorylierung sichtbar zu machen. Die gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Arnon u. Mitarbb.²² zeigt deutlich, daß es sich in beiden Fällen um das gleiche Phänomen handelt, das nur mit verschiedenen Mitteln untersucht wurde.

Ebenfalls nach Abschluß dieser Arbeit wurde mir eine Untersuchung Wintermans²⁴ bekannt.

²³ W. Vishniak u. S. J. Ochoa, J. biol. Chemistry 198, 501 [1952].

die sich mit der Anhäufung von Polyphosphat bei Belichtung beschäftigt. Dieses Phänomen wird als Zeichen für eine im Licht ablaufende Phosphorylierung gewertet. Die Polyphosphat-Anreicherung ist unabhängig von O_2 -Versorgung und CO_2 -Einbau. Sie wird durch DNP bei schwachem Licht stark, bei starkem Licht weniger stark gehemmt. Wintermans²⁴ kommt zu dem Schluß, daß im Reaktionsverlauf der Photosynthese dadurch $\sim\text{ph}$ gebildet wird, daß ein im Licht reduzierter Stoff wieder oxydiert wird, entsprechend der Rekombinationstheorie.

Die Befunde von Wintermans²⁴ sprechen weder gegen die Beobachtungen von Arnon und

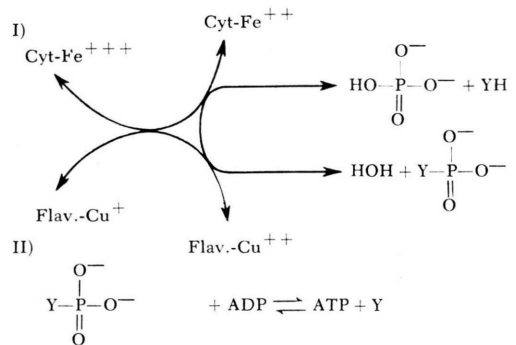


Abb. 8. Schema der Atmungsketten-Phosphorylierung nach Boyer und Mitarbb.²¹.

Mitarbb.²² noch gegen die eigenen, sondern paßt sich diesen gut an. Die Anschauung, daß eine lichtabhängige Phosphorylierung im engsten Sinn des Wortes existiert, schließt in keiner Weise aus, daß nicht auch zusätzlich die Rekombination realisiert sein kann. Es spricht nichts dagegen, daß der Wasserstoff, nachdem er unter $\sim\text{ph}$ -Bildung auf einen Akzeptor übertragen worden ist, weiterhin über die Atmungskette mit O_2 reagiert und erneut $\sim\text{ph}$ bildet, so daß im Endeffekt die gesamte Lichtenergie als „Phosphatenergie“ vorliegt. Die vorgelegten Befunde sprechen jedoch dagegen, daß dieser Vorgang die einzige Möglichkeit einer Entstehung energiereicher Phosphatbindungen im Zusammenhang mit der Photosynthese darstellt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft bin ich für die Unterstützung dieser Arbeit zu Dank verpflichtet.

²⁴ J. F. G. M. Wintermans, Unveröff. Manuskript.

* Herrn Dr. J. F. G. M. Wintermans bin ich für die Überlassung des Manuskriptes zu großem Dank verpflichtet.