

Energieübertragung von angeregtem Chlorophyll auf C₄₀-Polyene mit verschiedenen chromophoren Gruppen*

Von HEDWIG CLAES

Aus dem Department of Biological Sciences, Fels Fund, Florida State University, Tallahassee, Florida und
dem Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. MELCHERS, Tübingen
(Z. Naturforsch. 16 b, 445—454 [1961]; eingegangen am 27. April 1961)

Three chlorophyll sensitized light reactions (irreversible photoxydation and reversible photo-reduction of chlorophyll, and *cis-trans* isomerization of carotenes) were studied in presence of acyclic C₄₀-polyenes with 11, 9, 7, 5, and 3 conjugated double bonds.

The protective effect of carotenes containing 11 and 9 conjugated double bonds against photoxydation of chlorophyll saturates with increasing carotene concentrations and remains incomplete at carotene concentrations which fully prevent the anaerobic photoreduction.

The inefficiency of polyenes with shorter chromophores to protect chlorophyll against photoxydation can be slowly compensated by increasing the concentration of ζ -carotene but not of phytofluene.

Apparently the interaction between excited chlorophyll and carotenes becomes more sensitive to inhibition by O₂ with increasing saturation of the polyenes: The slight interference of phytofluene with photochemical reactions of chlorophyll, observed under anaerobic conditions, disappears in presence of air. ζ -carotene behaves like the less saturated polyenes in the absence of O₂ but not in solutions saturated with air.

Inhibition of energy transfer from excited chlorophyll to carotenes can also be observed with *p*-benzoquinone in place of O₂. The normally rapid *cis-trans* isomerization of polyenes sensitized by chlorophyll in light is slowed down in presence of O₂ or *p*-benzoquinone.

These results indicate a direct energy transfer from excited chlorophyll to carotenoids. But this happens only with the polyenes having a minimum length of the chromophore. O₂ is not necessary for this process. Apparently O₂, *p*-benzoquinone and carotenoids act independently as efficient quenchers of the triplet state of excited chlorophyll in the manner shown by FUJIMORI and LIVINGSTON²⁴. When present together, they compete for the quenching process.

Nach Blockierungen der Carotinoidsynthese bei verschiedenen photosynthetischen Organismen wurde beobachtet, daß in Gegenwart von Licht und O₂ Schädigungen auftreten, die sich bei den normalen Zellen nicht zeigen¹⁻⁷. Wie gefährlich sich in chlorophyllhaltigen Geweben ein Verlust der normalerweise synthetisierten Carotinoide auswirken kann, zeigten vor allem SISTROM, GRIFFITHS und STANIER⁴ bei einer Mutante von *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Die Mutante synthetisiert neben Bakteriochlorophyll an Stelle der normalen Carotinoide ein hochgesättigtes, farbloses C₄₀-Polyen (Phytoen). Im Gegensatz zum Wildtyp wird sie bei aerober Belichtung durch vom Chlorophyll sensibilisierte Photoxydationen letal geschädigt. Die Untersuchungen von SISTROM, GRIFFITHS und STANIER⁴ führten zu

dem Ergebnis, daß für diese Empfindlichkeit gegenüber aerober Belichtung das Fehlen der normalen, gefärbten Carotinoide in der Mutante verantwortlich ist. Die Autoren schließen daraus, daß Schutz des Chloroplasten gegen schädliche, vom Chlorophyll sensibilisierte Photoxydationen eine wichtige Funktion der Carotinoide ist. Ihre Hypothese stützt sich ferner darauf, daß außergewöhnliche aerobe Lichtempfindlichkeit auch in anderen photosynthetischen Organismen eine Begleiterscheinung von anormaler Carotinoidsynthese ist.

Über den Mechanismus der Schutzwirkung von Carotinoiden gegen vom Chlorophyll sensibilisierte Photoxydationen lagen bisher nur Vermutungen vor. Bekannt war, daß *in vitro* Chlorophyll die Autoxydation von Blattcarotinoiden im Licht sensibili-

* Die Untersuchungen wurden durch die Contracte NONR 432 (00) und NONR 988 (10) zwischen dem Office of Naval Research, Department of the Navy und der University of Chicago bzw. der Florida State University unterstützt.

¹ V. M. KOSKI u. J. H. C. SMITH, Arch. Biochem. Biophysics 34, 189 [1951].

² R. H. WALLACE u. A. E. SCHWARTING, Plant Physiol. 29, 431 [1954].

³ H. CLAES, Z. Naturforsch. 9 b, 461 [1954].

⁴ W. R. SISTROM, M. GRIFFITHS u. R. Y. STANIER, J. cellular comparat. Physiol. 48, 459 [1956].

⁵ G. COHEN-BAZIRE u. R. Y. STANIER, Nature [London] 181, 250 [1958].

⁶ R. C. FULLER u. I. C. ANDERSON, Nature [London] 181, 252 [1958].

⁷ R. SAGER u. M. ZALOKAR, Nature [London] 182, 98 [1958].

siert⁸⁻¹¹. Gleichzeitig wird das photoxydative Ausbleichen des Chlorophylls durch die Gegenwart der gelben Farbstoffe gehemmt. Es war anzunehmen, daß in Gegenwart von Chlorophyll, Licht und O₂ Carotinoide bevorzugte O₂-Akzeptoren sind und dadurch die Photoxydation des Chlorophylls einschränken. In der Zelle könnten die gelben Farbstoffe auf diese Weise auch andere Substanzen gegen schädliche, vom Chlorophyll sensibilisierte Photoxydationen abschirmen⁴.

In einer Stellungnahme zu den Ergebnissen von SISTROM, GRIFFITHS und STANIER⁴ diskutierte CALVIN¹² aber auch die Frage, ob die Energie von angeregtem Chlorophyll ** direkt auf Carotinoide übergehen kann, bevor Reaktionen mit molekularem O₂ aktiviert werden. Sensibilisierte Fluoreszenz, wie für die Übertragung von Anregungsenergie in der umgekehrten Richtung nachgewiesen wurde¹³, mußte dabei von vornherein wegen des höheren Energieniveaus der Carotinoide ausgeschlossen werden.

Um zu einem besseren Verständnis der Wechselwirkung zwischen Chl* und Carotinoiden zu gelangen, erschien es vorteilhafter, mit einem leichter kontrollierbaren System als der lebenden Zelle zu arbeiten. Aus diesem Grunde untersuchten wir zunächst die Schutzwirkung von Carotin auf das irreversible photoxydative Ausbleichen von Chlorophylllösungen¹⁴. Eine Serie acyklischer Carotine mit abgestufter Länge des konjugierten Systems wurde bei den Versuchen verwendet. Die z. T. farblosen Polyene mit chromophoren Gruppen von 3, 5, 7, 9 oder 11 konjugierten Doppelbindungen (Literatur über die Struktur der Polyene bei ZECHMEISTER¹⁵ und GOODWIN¹⁶) stauen sich in Pflanzen häufig bei Blockierungen der Carotinoidsynthese an Stelle der normalen Endprodukte mit spezifischer Struktur an¹⁶. Obwohl bekannt war, daß vor allem die stärker hydrierten Glieder der Serie den Chloroplasten nicht vor schädlichen Photoxydationen bewahren können, ergaben erst die Versuche mit reinen Farbstofflösungen ein genaueres Bild.

Es zeigte sich, daß Schutz des Chlorophylls gegen Photoxydation nur bei einer Mindestlänge des konjugierten Systems im Polyenmolekül auftritt. Phytoen, Phytofluene und ζ -Carotin mit 3,5 bzw. 7 konjugierten Doppelbindungen waren unwirksam. Neurosporen und Lycopin mit 9 bzw. 11 konjugierten Doppelbindungen und ein aus der chromophoren Gruppe von Lycopin bestehendes C₃₀-Polyen hemmten jedoch die Photoxydation von Chlorophyll, und zwar etwa gleich stark wie das in der Natur verbreitet als Begleiter des Chlorophylls auftretende β -Carotin.

Bei diesen Ergebnissen fiel auf, daß nicht die Gesamtzahl an oxydierbaren Doppelbindungen, sondern eine Mindestlänge des konjugierten Systems im Polyenmolekül für seine Schutzwirkung auf das Ausbleichen des Chlorophylls entscheidend war. Ein anderer Mechanismus als vom Chlorophyll sensibilisierte Photoxydation der Polyene mußte daher als Erklärung für die Schutzwirkung der Carotinoide vermutet werden. Hinzu kam die Beobachtung, daß Chlorophyll im Licht die Isomerisierung von *cis*-Carotin sensibilibisiert¹⁷. Diese Reaktion wird durch O₂ gehemmt und ist darum nur mit einer Energieübertragung von Chl* auf Carotin unter Ausschluß von O₂ zu verstehen.

Im folgenden vergleichen wir 3 verschiedene photochemische Reaktionen des Chlorophylls in Gegenwart von C₄₀-Polyenen mit verschiedenen chromophoren Gruppen. Dabei kommen wir zu dem Ergebnis, daß die Annahme einer direkten Reaktion zwischen dem Sensibilisator und den Polyenen unsere Befunde erklären kann.

Methodik

1. *Pigmente*. Chlorophyll *a* und Carotine wurden chromatographisch isoliert. Chlorophyll *a* wurde aus grünen Blättern gewonnen. Von β -Carotin, Lycopin und Neurosporen standen kristallisierte Präparate zur Verfügung. Phytoen, Phytofluene, ζ -Carotin, Protetrahydrolycopin und Prolycopin stammten aus einer Mutante von *Chlorella vulgaris* (Stamm 5/520)¹⁸.

⁸ K. NOACK, Z. Bot. **17**, 481 [1925].

⁹ K. NOACK, Biochem. Z. **183**, 153 [1927].

¹⁰ S. ARONOFF u. G. MCKINNEY, J. Amer. chem. Soc. **65**, 956 [1943].

¹¹ L. PEKOWITZ, J. biol. Chemistry **149**, 465 [1943].

¹² M. CALVIN, Nature [London] **176**, 1215 [1955].

** „Angeregtes Chlorophyll“ wird im folgenden als Chl* bezeichnet.

¹³ L. N. M. DUYSSENS, Dissertation, Utrecht 1952.

¹⁴ H. CLAES u. T. O. M. NAKAYAMA, Z. Naturforschg. **14b**, 746 [1959].

¹⁵ L. ZECHMEISTER, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe [Wien] **XVIII**, 223 [1960].

¹⁶ T. W. GOODWIN, in: Handbuch der Pflanzenphysiologie **V**, S. 394, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1960.

¹⁷ H. CLAES u. T. O. M. NAKAYAMA, Nature [London] **183**, 1053 [1959].

¹⁸ H. CLAES, Z. Naturforschg. **14b**, 4 [1959].

ζ -Carotin tritt in dieser Mutante in zwei isomeren Formen auf, deren Absorptionsspektren sich stark gleichen. Das an Al_2O_3 schwächer adsorbierte Isomer geht nach Isomerisierung, vor allem unter Zunahme der spezifischen Absorption, fast vollständig in das stärker adsorbierte Isomer über (Abb. 9). Es ist darum als ein *cis*- ζ -Carotin anzusehen, das allerdings in der Literatur im Gegensatz zu Protetrahydrolycopin¹⁵ und Prolycopin¹⁵ noch nicht beschrieben wurde.

2. *Belichtung.* Die Versuchslösungen wurden stets in einem Wasserbad (20° oder 23 °C) mit rotem, von den Carotinen selber nicht absorbiertem Licht bestrahlt. Als Lichtquelle diente eine 750-Watt-Projektionslampe. In den Strahlengang waren ein System von Linsen und ein 2,8 mm starkes Corning-Glas-Filter (Nr. 2404) mit einer Durchlässigkeit ab $\sim 620 \text{ m}\mu$ eingeschaltet.

3. *Irreversible Photooxydation des Chlorophylls.* Als Lösungsmittel wurde Benzol gewählt, da die nur mit einer schlechten Quantenausbeute verlaufende irreversible Photooxydation von Chlorophyll schneller in Benzol als in verschiedenen anderen Lösungsmitteln vor sich geht. — Die Farbstofflösungen einer Versuchsserie wurden stets gleichzeitig belichtet. Zu diesem Zweck waren die 15 mm starken Reagenzgläser mit den Versuchslösungen radial symmetrisch um eine sich im Lichtkegel drehende Achse angeordnet, so daß gleiche durchschnittliche Belichtungsstärke gesichert war. Der Chlorophyllgehalt wurde bei $665 \text{ m}\mu$ gemessen.

4. *Die reversible Photoreduktion des Chlorophylls.* Sie wurde in dest., jedoch nicht speziell getrocknetem Pyridin in Thunberg-Gläsern durchgeführt. Stets wurden 15 mg Ascorbinsäure in 6 cm^3 Farbstofflösung gelöst, sofort 3 min unter Verlust von $\sim 1 \text{ cm}^3$ Lösungsmittel evakuiert und dann 3 min belichtet. Nach Korrektur des Volumens wurde der Chlorophyllgehalt bei $670 \text{ m}\mu$ 1 min nach Belichtungsende gemessen.

5. *Isomerisierung.* Die Versuche (in Benzol) wurden in 15 mm starken Reagenzgläsern durchgeführt, die mit Vakuumschliffen verschlossen waren. Im Dunkeln wurde durch Kapillaren unmittelbar vor der Belichtung 30 min über Palladium geleiteter H_2 oder Luft in die Lösungen eingeleitet.

Der Verlauf der Isomerisierung wurde aus den charakteristischen Veränderungen der Absorptionsspektren während der Belichtung abgelesen. Am auffälligsten sind diese Veränderungen bei der Wellenlänge, wo das langwellige Maximum der *all-trans*-Form¹⁵ liegt. Wie Abb. 8 zeigt, entsteht dieses Maximum während der Isomerisierung von Prolycopin bei $519 \text{ m}\mu$. Ebenfalls stark ausgeprägt sind die qualitativen Veränderungen des Spektrums bei der Isomerisierung von Protetrahydrolycopin. Das langwellige Maximum der *all-trans*-Form bildet sich bei $482 \text{ m}\mu$ aus. Bei *cis*- ζ -Carotin bleibt der Charakter des Spektrums während der Isomerisierung im wesentlichen erhalten. Zu beobachten ist vor allem eine Zunahme der spezifischen Absorption, die auch hier bei dem langwelligen Maximum ($435 \text{ m}\mu$) am stärksten ist (Abb. 9).

Die Zunahme der Extinktion bei den genannten Wellenlängen (in Benzol) wurde als Maß für den Fort-

schritt der Isomerisierung angesehen. Diese Methode erwies sich als ausreichend, um die hier zunächst interessierenden Fragen zu klären. Um die Kinetik der Isomerisierung genau zu untersuchen, sind chromatographische Analysen erforderlich.

Ergebnisse

a) Der Einfluß von C_{40} -Polyenen auf die irreversible Photooxydation von Chlorophyll a

Die bereits veröffentlichten Versuche¹⁴ über das photooxydative Ausbleichen von Chlorophyll in Gegenwart verschieden stark hydrierter Polyene waren bei äquimolaren Konzentrationen von Sensibilisator und Carotin durchgeführt worden. Unter diesen Bedingungen bleichte Chlorophyll auch in Gegenwart der wirksamen Polyene noch ganz erheblich aus. Darum war zunächst festzustellen, wie weit die Carotin-Konzentrationen für den unvollkommenen oder bei den stärker hydrierten Polyenen fehlenden Schutz des Chlorophylls verantwortlich waren.

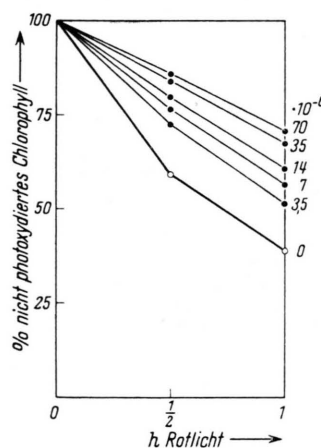


Abb. 1. Hemmung der Photooxydation von Chlorophyll a ($7 \cdot 10^{-6} \text{ m}$ in Benzol) durch Lycopin. Die Carotin-Konzentrationen sind in Mol/l für die einzelnen Kurven angegeben. Ordinate: (Chl. nach Belichtung/Chl. vor Belichtung) $\cdot 100$.

Abb. 1 zeigt für Lycopin, daß Chlorophylllösungen mit zunehmender Carotin-Konzentration stabiler gegen Photooxydation werden. Der Schutz des grünen Farbstoffs nimmt jedoch nicht stetig mit der Konzentration des Carotins zu. Sobald ein molares Verhältnis Carotin/Chlorophyll ~ 2 überschritten ist, verbessert er sich nur noch sehr langsam (Abb. 2). β -Carotin verhält sich so ähnlich wie Lycopin. Die Werte wurden darum der Übersichtlichkeit wegen nicht in Abb. 2 eingetragen.

Von den acyklischen Polyenen mit abgestufter Zahl der konjugierten Doppelbindungen wirkt auch Neurosporen auf das Ausbleichen von $7 \cdot 10^{-6}$ -m. Chlorophylllösungen im wesentlichen wie Lycopin (Abb. 2). Im Fall von ζ -Carotin weichen die Befunde bei höheren Carotin-Konzentrationen von unseren ersten Versuchsergebnissen ab. Es zeigt sich nämlich, daß auch ζ -Carotin auf das Ausbleichen von Chlorophyll einen Schutz ausübt. Dieser tritt aber erst bei höheren Polyen-Konzentrationen als ursprünglich verwendet wurden gesichert in Erscheinung und ist auch dann noch viel schlechter als bei den weniger hydrierten Polyenen (Abb. 2). Im Gegensatz zu ζ -Carotin bleibt das farblose Phytofluoren auch bei zunehmenden Polyen-Konzentrationen unwirksam (Abb. 2).

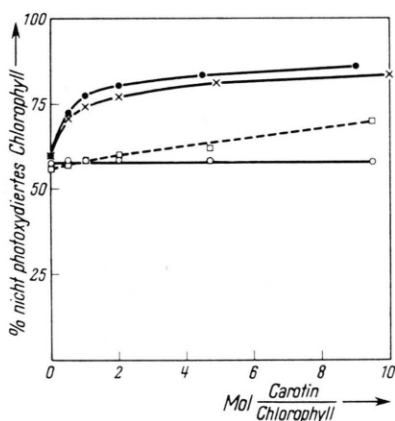


Abb. 2. Hemmung der Photoxydation von Chlorophyll *a* ($7 \cdot 10^{-6}$ -m. in Benzol) durch Polyene mit 5 (Phytofluoren $\circ$ — $\circ$), 7 (ζ -Carotin $\square$ — $\square$), 9 (Neurosporen $\times$ — $\times$) und 11 (Lycopin $\bullet$ — $\bullet$) konjugierten Doppelbindungen. Ordinate: (Chl. nach $1/2$ Stde. Rotlicht/Chl. vor Belichtung) $\cdot 100$.

Um einen Anhaltspunkt über die Abhängigkeit dieser Befunde von den absoluten Farbstoff-Konzentrationen zu gewinnen, wurde die Schutzwirkung von β -Carotin in verschiedenen konzentrierten Chlorophylllösungen geprüft. Aus Abb. 3 geht hervor, daß sich die Schutzwirkung des Carotins mit Erhöhung der absoluten Farbstoff-Konzentrationen deutlich verbessert. Kaum beeinflusst blieb jedoch bei den verschiedenen konzentrierten Chlorophylllösungen das Verhältnis Carotin/Chlorophyll, bei dem Sättigung des Schutzeffektes eintrat.

Dem Schutz des Chlorophylls durch Carotine gegen Photoxydation sind also zweierlei Grenzen gesetzt. Erstens ist bei der hier untersuchten Serie

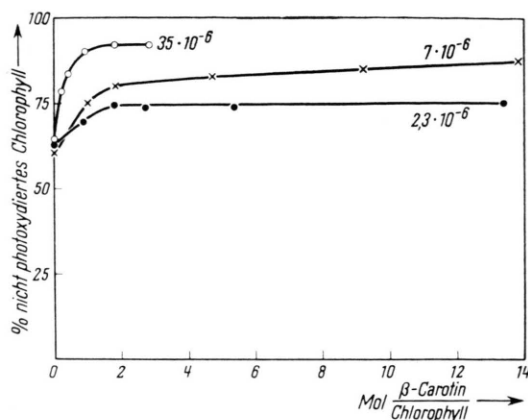


Abb. 3. Hemmung der Photoxydation von Chlorophyll *a* ($2,3 \cdot 10^{-6}$, $7 \cdot 10^{-6}$ und $35 \cdot 10^{-6}$ -m. in Benzol) durch β -Carotin. Ordinate: wie Abb. 2.

acyklischer C_{40} -Polyene eine Mindestlänge des konjugierten Systems im Polyenmolekül notwendig, damit überhaupt ein Schutzeffekt eintritt. Zweitens wirkt sich, wie aus Abb. 3 hervorgeht, die absolute Konzentration der Farbstoffe begrenzend aus.

b) Die Photoxydation der Carotine

Im Hinblick auf die Frage, ob in Gegenwart von Chlorophyll, Licht und O_2 die Carotinoide bevorzugte O_2 -Akzeptoren sind und auf diese Weise das Chlorophyll gegen Photoxydation abschirmen, ist ihr Schicksal während der Belichtung von Interesse.

Bereits andere Autoren beobachteten, daß *in vitro* Chlorophyll bei aerober Belichtung das Ausbleichen von Carotinoiden sensibilisiert⁸⁻¹¹. Es ist anzunehmen, daß es sich dabei um Oxydation der Polyene zu farblosen Produkten, die allerdings noch nie genauer identifiziert wurden, handelt. Auch bei den in Abb. 2 dargestellten Versuchen bleichten fast alle Carotine während der $1/2$ -stdg. aeroben Belichtung in Gegenwart von $7 \cdot 10^{-6}$ -m. Chlorophyll aus. Die Abnahme der Absorption von β -Carotin, Lycopin, Neurosporen und ζ -Carotin unter diesen Bedingungen geht, umgerechnet in Mol Carotin, aus Abb. 4 hervor. Für jedes dieser Polyene ist ferner die Menge an gleichzeitig geschütztem Chlorophyll angegeben.

Abb. 4 zeigt auffallende Unterschiede in der Stabilität der Polyene in Gegenwart von aerob belichtetem Chlorophyll. Obwohl Lycopin, β -Carotin und Neurosporen das Chlorophyll etwa gleich gut gegen den Angriff von O_2 abschirmen können, war ihre

Zerstörung sehr verschieden und bei Lycopin überhaupt nicht vorhanden. Das im Vergleich zu den genannten Polyenen nur schwach schützende ζ -Carotin hingegen bleichte besonders stark aus. Eine Übereinstimmung zwischen zerstörtem Carotin und geschütztem Chlorophyll ist also nicht vorhanden.

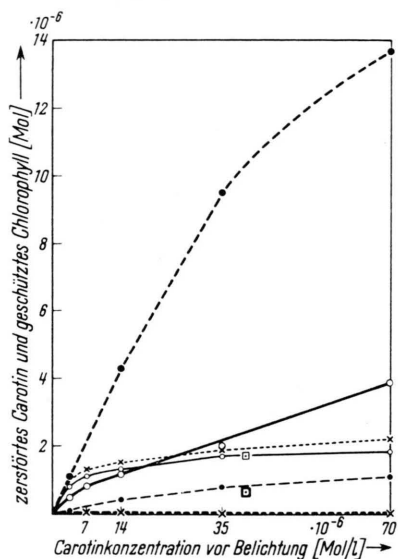


Abb. 4. Photoxydation der Carotine bei $\frac{1}{2}$ -stdg. aerober Belichtung von Chlorophyll-Carotinemischen (in Benzol). Chlorophyllkonzentration vor Belichtung: $7 \cdot 10^{-6}$ -m. Ordinate: Mol während der Belichtung zerstörtes Lycopin (x—x), Neurosporen (o—o), ζ -Carotin (•—•) und β -Carotin (□). Die gleich, aber schwächer signierten Kurven geben an, wieviel Mol Chlorophyll durch jedes der Carotine während der $\frac{1}{2}$ -stdg. Belichtung geschützt wurden. — Für β -Carotin ist der Übersichtlichkeit wegen jeweils nur ein Wert angegeben.

Die vom Chlorophyll sensibilisierte Photoxydation von Carotin kann demnach die Schutzwirkung der Polyene auf die Photoxydation des Chlorophylls nicht ohne weiteres erklären.

c) Der Einfluß von C_{40} -Polyenen auf die reversible Photoreduktion von Chlorophyll *a* durch Ascorbinsäure

Nach den vorangegangenen Ausführungen hemmen auch die am besten schützenden Carotine die Photoxydation von verdünnten Chlorophylllösungen unvollständig. Allein durch Erhöhung der Carotinkonzentrationen verbesserte sich zwar der Schutz

des Chlorophylls, jedoch nach Überschreiten eines molaren Verhältnisses von Carotin/Chlorophyll ~ 2 nur noch sehr langsam.

Daß dem Schutz des Chlorophylls durch Carotin gegen Photoxydation vermutlich auch durch O_2 gewisse Schranken gesetzt sind, deutete sich bei Veränderung der O_2 -Konzentration in den Versuchen an. Die irreversible Photoxydation von Chlorophyll erreicht schon bei niedrigen O_2 -Drucken Sättigung¹⁹. Eine 40-fache Herabsetzung der O_2 -Konzentration (die Lösungen wurden mit $N_2 + 0,5\%$ O_2 anstatt mit Luft gesättigt) beeinflusste die Ausbleichgeschwindigkeit reiner Chlorophylllösungen noch nicht. Abb. 5 zeigt jedoch, daß sich die Schutzwirkung von β -Carotin bei der niedrigeren O_2 -Konzentration verbesserte. Dieser Effekt war nur gering, deutete aber an, daß O_2 der Wechselwirkung zwischen Chl^* und Carotin entgegenwirkt.

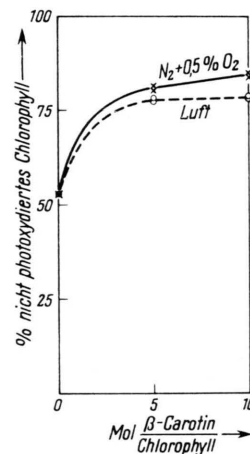


Abb. 5. Hemmung der Photoxydation von Chlorophyll *a* ($7 \cdot 10^{-6}$ -m. in Benzol) durch β -Carotin bei herabgesetztem O_2 -Druck. Ordinate: wie Abb. 2.

Um die Frage einer möglichen Konkurrenz von Carotin und O_2 um die Anregungsenergie von Chl^* zu klären, schalteten wir den Sauerstoff vollständig aus dem System Chl^* -Carotin aus. Dazu war es notwendig, zu einer unter anaeroben Bedingungen ablaufenden photochemischen Reaktion des Chlorophylls überzugehen. Wir untersuchten darum den Einfluß von Carotin auf die reversible Photoreduktion des Chlorophylls durch Ascorbinsäure²⁰.

Dabei stellte sich heraus, daß Carotine auch die reversible Photoreduktion des Chlorophylls hem-

¹⁹ R. LIVINGSTON, in: Photosynthesis in Plants, Iowa State College Press, Ames, Iowa 1949.

²⁰ A. A. KRASNOVSKY, C. R. [Doklady] Acad. Sci. USSR **60**, 421 [1948].

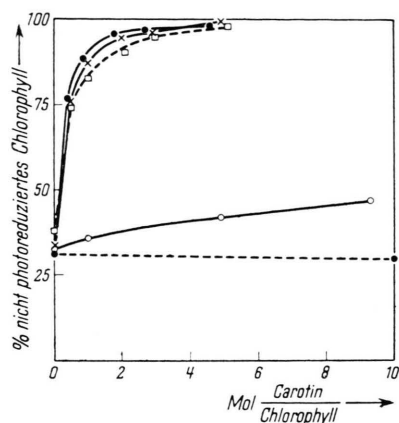


Abb. 6. Photoreduktion von Chlorophyll *a* ($7 \cdot 10^{-6} m$, in Pyridin) durch Ascorbinsäure in Gegenwart von Polyenen mit 3 (Phytoen ●—●), 5 (Phytofluene ○—○), 7 (ζ-Carotin □—□), 9 (Neurosporen ×—×) und 11 (Lycopin ●—●) konjugierten Doppelbindungen. Ordinate: (Chl. nach 3 min Licht/Chl. vor Belichtung) $\cdot 100$.

men (s. auch KRASNOVSKY)²¹, und zwar sehr viel wirksamer als seine Photooxydation (Abb. 2 und 6 sowie die Übersicht in Abb. 7). $7 \cdot 10^{-6} m$. Chlorophylllösungen wurden z. B. durch die 5-fache Menge an Lycopin vollständig gegen Photoreduktion geschützt (Abb. 6), bleichten unter oxydativen Bedingungen aber noch beträchtlich aus (Abb. 2).

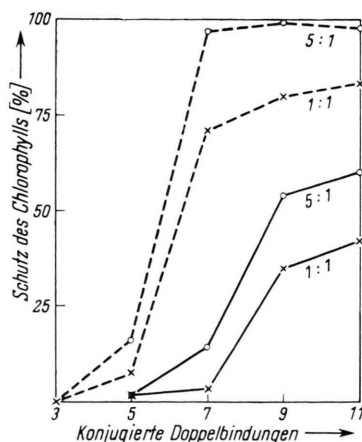


Abb. 7. Photooxydation (×—× ○—○) und Photoreduktion (×—× ○—○) von $7 \cdot 10^{-6} m$. Chlorophyll *a* in Gegenwart von C_{40} -Polyenen mit abgestufter Zahl an konjugierten Doppelbindungen. Das Verhältnis Carotin/Chl. ist bei den Kurven angegeben. Ordinate: $(E_3 - E_2 / E_1 - E_2) \cdot 100$, wobei E_1 = Chl. vor Belichtung, E_2 = Chl. nach $1/2$ -stdg. Belichtung und E_3 = Chl. nach $1/2$ -stdg. Belichtung in Gegenwart von Carotin. Die Werte beruhen auf Umrechnung der in Abb. 2 und 6 in anderem Maßstab dargestellten Versuchsergebnisse.

²¹ A. A. KRASNOVSKY, N. N. DROSDOVA u. E. V. PAKSHINA, *Biochimica* **25**, 288 [1960].

Auch bei der Photoreduktion des Chlorophylls entscheidet die chromophore Gruppe im Polyenmolekül darüber, ob Hemmung der photochemischen Reaktion eintritt oder nicht. Wie bei der Photooxydation des Chlorophylls waren Lycopin und Neurosporen etwa gleich wirksam. Im Gegensatz zu den Oxydationsversuchen ist jedoch ζ-Carotin unter den anaeroben Bedingungen fast ebenso wirksam wie Neurosporen und Lycopin. Erst bei 5 konjugierten Doppelbindungen (Phytofluene) klingt der Schutzeffekt stark ab und ist bei 3 (Phytoen) nicht mehr vorhanden (Abb. 6).

Zwei ganz verschiedene photochemische Reaktionen des Chlorophylls, seine irreversible Photooxydation sowie seine reversible Photoreduktion, werden also durch Carotin gehemmt. In beiden Fällen ist der Schutzeffekt an eine Mindestlänge des konjugierten Systems im Polyenmolekül gebunden. Die Photoreduktion des Chlorophylls ist jedoch leichter durch Carotin zu hemmen als seine Photooxydation. Außerdem ist die für den Schutzeffekt des Carotins begrenzende Zahl an konjugierten Doppelbindungen im Polyenmolekül bei der anaeroben Photoreduktion um zwei geringer als bei der Photooxydation des Chlorophylls.

Diese Differenzen könnten mit den verschiedenen Reaktionsmechanismen von Photooxydation und Photoreduktion zusammenhängen. Zur Diskussion steht aber auch die Möglichkeit, daß die Abwesenheit von O_2 bei der Photoreduktion eine Wechselwirkung zwischen Chl^* und Carotin begünstigt. Ein Anhaltspunkt hierfür ergab sich, als eine Herabsetzung der O_2 -Konzentration unter sonst gleichen Bedingungen zu besserem Schutz des Chlorophylls durch β-Carotin gegen Photooxydation führte (Abb. 5).

d) *cis-trans*-Isomerisierung von Carotin in Gegenwart von belichtetem Chlorophyll

Als dritte photochemische Reaktion untersuchten wir die von Chl^* sensibilisierte Isomerisierung von *cis*-Carotin¹⁷ (Literatur über die Stereokonfiguration von Carotinoiden bei ZECHMEISTER¹⁵). Dabei wurden *cis*-Isomere von Lycopin (Prolycopin), Neurosporen (Protetrahydrolycopin) und ζ-Carotin verwendet. Während es sich bei Prolycopin und Protetrahydrolycopin wahrscheinlich um Poly-*cis*-Isomere handelt, ist die Zahl der *cis*-Bindungen bei *cis*-ζ-Carotin unbekannt.

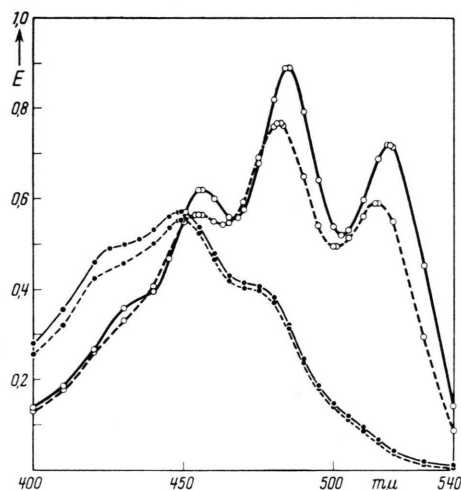


Abb. 8. Absorptionsspektrum von Prolycopin (in Benzol) a) vor (●—●) und nach (○—○) Isomerisierung mit Jod, b) vor (●—●) und nach (○—○) Isomerisierung mit Chl. $6 \cdot 10^{-6} m.$ Carotin, $3 \cdot 10^{-7} m.$ Chlorophyll, $\sim 5 \cdot 10^{-6} m.$ Jod.

In den Versuchen zeigten sich zunächst Unterschiede, je nachdem, ob die Isomerisierung der Carotine mit Jod oder mit Chl* katalysiert wurde. Mit Chl* sind die bei Katalyse mit Jod auftretenden charakteristischen Veränderungen (Abnahme der spezifischen Extinktion und Verschiebung der Maxima zu kürzeren Wellenlängen) in den Spektren der *all-trans*-Formen nicht zu beobachten. Ist die

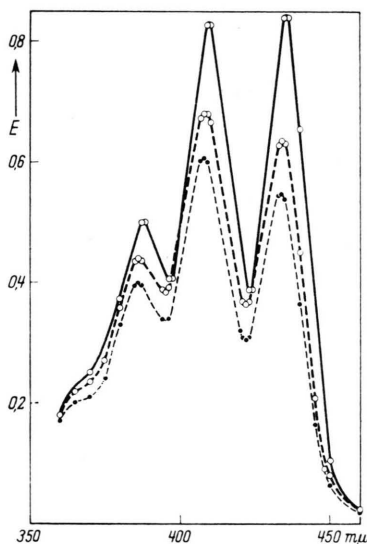


Abb. 9. Absorptionsspektrum von *cis*- ζ -Carotin (in Benzol) a) vor (●—●) und nach (○—○) Isomerisierung mit Jod, b) nach Isomerisierung mit Chl. (○—○). Carotin-, Chlorophyll- und Jodkonzentration wie Abb. 8.

Ausgangskonfiguration des Carotins aber *cis*, so stellt sich mit Chl* ein Gleichgewicht ein, dessen Spektrum sehr viel weiter zur *all-trans*-Form verschoben ist als bei Isomerisierung mit Jod. Abb. 8 und 9 zeigen, wie sich bei Prolycopin bzw. *cis*- ζ -Carotin nach Beendigung der Reaktion die Absorptionsmaxima in den Isomerengemischen bei Katalyse mit Chl* wesentlich stärker ausgeprägt haben als bei Katalyse mit Jod.

Die Differenzen in den Spektren von nicht belichtetem Prolycopin in Abb. 8 beruhen auf der zusätzlichen Absorption des Chlorophylls in dem etwas höher liegenden Spektrum. In Abb. 9 wurde das Spektrum der noch nicht belichteten chlorophyllhaltigen Lösung von *cis*- ζ -Carotin der Übersichtlichkeit wegen nicht eingetragen.

Wie bei anaerober Belichtung die Isomerisierung von $6 \cdot 10^{-6} m.$ Carotinlösungen durch $3 \cdot 10^{-7} m.$ Chlorophyll von der Belichtungszeit abhängig war, geht aus Abb. 10 hervor. Absolute Angaben über den Umsatz der *cis*-Isomere in Gegenwart von Chl* sind mit der angewandten Methode nicht möglich.

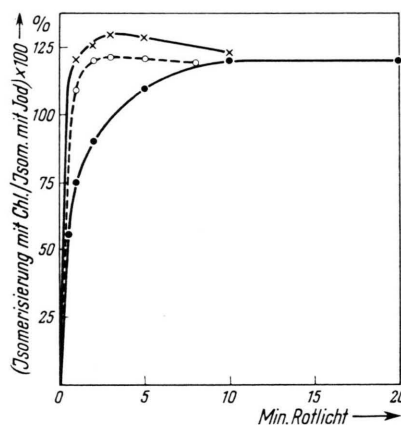


Abb. 10. Durch Chlorophyll *a* ($3 \cdot 10^{-7} m.$ in Benzol) im Licht sensibilisierte Isomerisierung von je $6 \cdot 10^{-6} m.$ *cis*- ζ -Carotin (x—x), Protetrahydrolycopin (○—○) und Prolycopin (●—●). Ordinate: (Isom. mit Chl./Isom. mit Jod) $\cdot 100$.

Darum wurde in Abb. 10 die nach den verschiedenen Belichtungszeiten gemessene Extinktion bei den langwelligen Maxima der Isomerengemische in % der maximal mit Jod erreichbaren Extinktion bei den entsprechenden Wellenlängen angegeben. Wie bereits in den Spektren der Abb. 8 und 9 gezeigt, kommt auch in Abb. 10 zum Ausdruck, daß nach Isomerisierung mit Chl* das Gleichgewicht stärker zu den *all-trans*-Formen verschoben ist als bei Isomerisierung mit Jod.

Aus diesen Befunden ist zu schließen, daß die Energie von Chl^* nur in einer Richtung Isomerisierung der Carotine erlaubt: *cis* $\rightarrow$ *trans*. Um die *all-trans*-Form in die energiereicheren Konfigurationen mit *cis*-Bindungen umzuordnen, reicht die Anregungsenergie des Chlorophylls offensichtlich nicht aus. Die Verhältnisse liegen also anders als bei Katalyse mit Jod. Die Isomerisierung verläuft dann in beiden Richtungen, und folglich stellt sich ein Gleichgewicht verschiedener Isomere unabhängig von der Ausgangskonfiguration des Carotins ein.

Im übrigen bieten die Isomerisierungs-Versuche den Vorteil, daß hier das gleiche photochemische System unter anaeroben und aeroben Bedingungen untersucht werden kann. Allein durch Änderung der Atmosphäre läßt sich zeigen, daß die Energieübertragung von Chl^* auf Carotin durch O_2 gestört wird.

	aerobe Isom. anaerobe Isom.
Prolycopin	0,12
Protetrahydrolycopin	0,32
<i>cis</i> - ζ -Carotin	0,14

Tab. 1. Der Einfluß von O_2 auf die durch Chlorophyll *a* im Licht sensibilisierte Isomerisierung von *cis*-Carotinen. Pigmentkonzentrationen wie Abb. 10. Belichtung: 1 min. anaerob bzw. aerob.

Die Hemmung der von Chl^* sensibilisierten Carotin-Isomerisierung durch O_2 geht aus der Tabelle hervor. Die Zunahme der Extinktion bei den langwelligen Absorptionsmaxima hatte nach 1 min aerober Belichtung nur 30% oder weniger der entsprechenden Werte nach gleich langer anaerober Belichtung erreicht. Diese Hemmung der Isomerisierung durch O_2 kann nicht durch Photoxydation der Farbstoffe während der nur 1 min dauernden aeroben Belichtung vorgetäuscht sein, denn die Rotabsorption des Chlorophylls veränderte sich in dieser Zeit nicht meßbar. Lycopin wurde bei 30-mal längerer Belichtung und in Gegenwart der 20-fachen Chlorophyll-Konzentration nicht durch O_2 angegriffen (Abb. 4). Dagegen können die Werte für Protetrahydrolycopin und *cis*- ζ -Carotin durch Photoxydation der Polyene während der aeroben Belichtung beeinflusst sein. Aus Abb. 4 ging hervor, daß diese beiden Carotine in Gegenwart von Chl^* und O_2 nicht sehr stabil sind.

Eine deutliche Hemmung der von Chl^* sensibilisierten Isomerisierung von *cis*-Polyenen tritt auch dann ein, wenn einem anaeroben Chlorophyll-Carotiningemisch *p*-Benzochinon zugesetzt wird. Abb. 11 zeigt, daß das Chinon die Ausprägung der langwelligen Maxima in den Isomerengemischen auf 27% und weniger der entsprechenden Werte in den chinonfreien Kontrollen reduzierte.

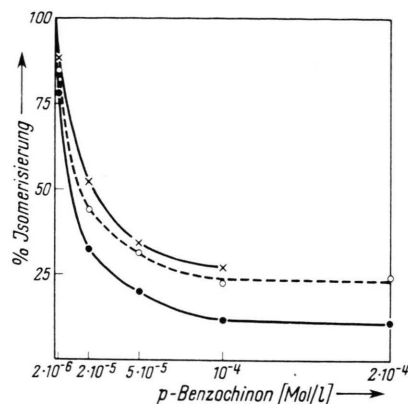


Abb. 11. Der Einfluß von *p*-Benzochinon auf die durch Chlorophyll *a* im Licht sensibilisierte Isomerisierung von *cis*- ζ -Carotin ($\times$ — $\times$), Protetrahydrolycopin ($\circ$ — $\circ$) und Prolycopin ($\bullet$ — $\bullet$). Pigmentkonzentrationen wie Abb. 10. Belichtung: 1 min anaerob. Ordinate: (Isom. in Gegenwart von Chinon/Isom. ohne Chinon) $\cdot$ 100.

In Abb. 10 und 11 sowie in der Tabelle zeigen sich Differenzen zwischen den verschiedenen Polyenen. Diese sind jedoch ohne Bedeutung. Die Zunahme der Extinktion bei den langwelligen Maxima der Isomerengemische ist nur ein relatives Maß für die Bildung der *all-trans*-Form. Außerdem wird die Geschwindigkeit, mit der die *all-trans*-Form während der Isomerisierung auftritt, wesentlich durch die Zahl der zu ihrer Bildung führenden Reaktionsschritte, die bei den verwendeten *cis*-Carotinen wahrscheinlich verschieden ist, beeinflusst. Bisher ist nur für Prolycopin nachgewiesen, daß es bei Isomerisierung mit Jod schrittweise über zahlreiche Isomere mit weniger *cis*-Bindungen in die *all-trans*-Form übergeht¹⁵. Auf Unterschiede in der Zahl der bei der Isomerisierung durchlaufenen Zwischenstufen bei den hier untersuchten Polyenen könnte zurückzuführen sein, daß wir mit unserer Methode bei Prolycopin eine auffallend langsamere Isomerisierung als bei den beiden anderen *cis*-Isomeren fanden (Abb. 10).

Diskussion

Die beschriebenen Untersuchungen zeigen, daß die anaerob verlaufende, reversible Photoreduktion des Chlorophylls ebenso durch Carotin zu hemmen ist wie seine irreversible Photoxydation. Der Einfluß von Carotin auf photochemische Reaktionen des

Chlorophylls ist also nicht an die Gegenwart von O_2 gebunden.

Die genauen Reaktionsmechanismen der irreversiblen Photooxydation und der reversiblen Photoreduktion des Chlorophylls sind, wie aus der umfangreichen Literatur (Angaben u. a. bei RABINOWITCH²² und LIVINGSTON²³) zu dieser Frage hervorgeht, noch nicht bekannt. Sicher handelt es sich jedoch bei der irreversiblen Photooxydation und reversiblen Photoreduktion des Chlorophylls um derart verschiedene Reaktionen, daß nur die Anregung des Sensibilisators durch Licht ein beiden Reaktionen gemeinsamer Vorgang ist. Wenn Carotin hemmend in den Ablauf beider Reaktionen eingreift, so ist dies offensichtlich nur durch eine Reaktion mit dem angeregten Sensibilisator möglich.

Das Ergebnis der Reaktion zwischen Chl^* und Carotin ist bei Bestrahlung von Chlorophyll in Gegenwart von *cis*-Carotinen an einer Veränderung der Stereokonfiguration der Polyene unmittelbar zu erkennen. Auch die von Chl^* sensibilisierte Isomerisierung der Carotine ist nicht an O_2 gebunden.

Bereits vor einigen Jahren stellten FUJIMORI und LIVINGSTON²⁴ durch direkte Messungen fest, daß Carotinoide die Lebensdauer von metastabilem Chlorophyll verkürzen. Polyene mit 10 oder 11 konjugierten Doppelbindungen (α -, β -Carotin, Lutein und Zeaxanthin) löschen ebenso wie O_2 und *p*-Benzochinon die Tripletanregung des Chlorophylls wirksam aus. Wir fanden, daß die von Chl^* sensibilisierte *cis-trans*-Isomerisierung von Carotin durch O_2 ebenso wie durch *p*-Benzochinon stark gehemmt wird. Es ist darum anzunehmen, daß in den hier beschriebenen Versuchen die Reaktion zwischen Chl^* und Carotin in der von FUJIMORI und LIVINGSTON²⁴ durch direkte Messungen nachgewiesenen Löschung der Tripletanregung des Chlorophylls durch Carotin besteht. Wie vor allem die von Chl^* sensibilisierte Isomerisierung von *cis*-Carotinen zeigt, tritt offensichtlich bei gleichzeitiger Anwesenheit von Carotin und O_2 bzw. *p*-Benzochinon Konkurrenz um die Anregungsenergie des Chlorophylls auf, und die Isomerisierung der Carotine wird dadurch gehemmt.

Es fragt sich, wieweit Konkurrenz von Carotin und O_2 um die Energie von Chl^* auch dafür ver-

antwortlich ist, daß die Photooxydation des Chlorophylls schwerer durch Carotin zu hemmen ist als seine anaerobe Photoreduktion. Die von Chl^* sensibilisierte Isomerisierung von *cis*-Carotinen ist wahrscheinlich ein relativ einfacher Vorgang mit sehr guter Quantenausbeute. In den Versuchen wurde das unmittelbare Ergebnis der Energieübertragung zwischen Chl^* und Carotin, nämlich die Isomerisierung des Energieakzeptors, gemessen. Die durch Zugabe von O_2 bedingte Hemmung dieses Vorgangs dürfte allein mit einer Konkurrenz von Carotin und O_2 um die Energie von Chl^* zu erklären sein.

In den Versuchen über die Wirkung von Carotin auf Photooxydation und Photoreduktion des Chlorophylls wurde jedoch, im Gegensatz zu den Isomerisierungs-Versuchen, das Endergebnis (photooxydatives bzw. photoreduktives Ausbleichen des Chlorophylls) von zwei verschiedenartigen und komplizierteren Reaktionen gemessen. Wenn sich unter diesen Voraussetzungen herausstellt, daß die Photooxydation des Chlorophylls schwerer durch Carotin zu hemmen ist als seine Photoreduktion, so ist damit noch nicht bewiesen, daß allein die Gegenwart von O_2 nur in einem der beiden photochemischen Systeme für diese Differenz verantwortlich ist. Wie aus Abb. 3 hervorgeht, wird die Schutzwirkung von Carotin auf die Photooxydation des Chlorophylls auch durch die Konzentration des Chlorophylls eingeschränkt. Außerdem sind die Sättigungskurven in den Abb. 1–3 nicht ohne weiteres mit einer einfachen Konkurrenz von Carotin und O_2 um die Energie von Chl^* zu erklären. Wäre O_2 allein der auf diese Weise die Schutzwirkung des Carotins einschränkende Faktor, so sollte seine Konkurrenz durch Steigerung der Carotinkonzentration auszuschalten sein.

Die unterschiedliche Wirkung von Carotin auf Photooxydation und Photoreduktion des Chlorophylls ist also noch nicht ohne weiteres zu verstehen. Wie sich bei herabgesetzter O_2 -Konzentration (Abb. 5) zeigte, spielt sicher auch bei der Photooxydation des Chlorophylls die Konkurrenz von Carotin und O_2 um die Energie von Chl^* eine Rolle. Wahrscheinlich sind aber noch andere Faktoren mit dafür verantwortlich, daß Carotin die Photooxyda-

²² E. RABINOWITCH, Photosynthesis, New York: Interscience Publ. Vol. I (1945), Vol. II (1956).

²³ R. LIVINGSTON, in: Handbuch der Pflanzenphysiologie V, 830, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1960.

²⁴ E. FUJIMORI u. R. LIVINGSTON, Nature [London] **180**, 1036 [1957].

tion des Chlorophylls weniger wirksam als seine Photoreduktion hemmt.

Unserer Erklärung der Versuchsergebnisse widerspricht die Tatsache nicht, daß bei aerober Belichtung von Chlorophyll in Gegenwart von Carotin auch Photoxydation des Carotins eintritt. Wahrscheinlich werden vom Chlorophyll sensibilisierte Photo-Autoxydationen mit einer Aktivierung von O_2 durch den angeregten Sensibilisator eingeleitet^{23, 24}. Je wirksamer also ein Polyen die Anregungsenergie von Chlorophyll löschen und dadurch eine Aktivierung von O_2 hemmen kann, um so geringer sollte die Chance für seine Photoxydation sein. Die in den Versuchen beobachtete Carotin-Zerstörung scheint sich in dieses Schema einzufügen: auffallend stabil erwies sich das gut schützende Lycopin. Dagegen wurde das nur schwach schützende ζ -Carotin besonders stark zerstört.

Obwohl mögliche Mechanismen von CALVIN¹² und PLATT²⁵ diskutiert wurden, sind die genauen Vorgänge bei der Energieübertragung zwischen metastabilem Chlorophyll und dem konjugierten System der Polyene noch nicht zu verstehen. Die hier beschriebenen Versuche können nur zeigen, daß für die Reaktion zwischen Chl^* und Carotin eine Mindestanzahl von konjugierten Doppelbindungen im Polylenmolekül Voraussetzung ist. In Gegenwart von O_2 nimmt dieser Grenzwert um 2 Doppelbindungen zu. Diese Verschiebung deutet darauf hin, daß die stärker hydrierten Polyene die Anregung von metastabilem Chlorophyll weniger wirksam löschen als O_2 und die gesättigteren Polyene. In Gegenwart von Phytofluoren und ζ -Carotin hat vermutlich der O_2 wesentliche bessere Chancen, mit Chl^* zu reagieren als die beiden Polyene.

Möglicherweise ist die Reaktion zwischen Chl^* und Carotin ebenso wie die spektralen Eigenschaften der Polyene nicht nur von der Länge, sondern auch von der Form ihrer chromophoren Gruppen abhängig. Die Chromophore der hier untersuchten acyklischen C_{40} -Polyene unterscheiden sich allein durch ihre Länge, und folglich sind ihre Spektren vor allem von der Zahl der konjugierten Doppelbindungen abhängig. Es läßt sich darum allein mit diesen Polyenen nicht klären, ob tatsächlich nur die Zahl der konjugierten Doppelbindungen oder die durch Form und Gehalt an konjugierten Doppel-

bindungen der chromophoren Gruppe bedingten elektronischen Eigenschaften der Polyene die entscheidende Rolle spielen. So hat z. B. Prolycopin die gleiche Zahl an konjugierten Doppelbindungen wie *all-trans*-Lycopin. Sein Spektrum ist jedoch infolge seiner besonderen Stereokonfiguration gegenüber der *all-trans*-Form stark zu kürzeren Wellenlängen verschoben. Anhaltspunkte sind dafür vorhanden, daß Prolycopin die Photoxydation von Chlorophyll schwächer als *all-trans*-Lycopin hemmt.

Im Zusammenhang mit unseren Versuchsergebnissen ist von Interesse, daß nach SCHENCK²⁶ Cyclooctatetraen die durch Methylenblau im Licht sensibilisierte Oxydation verschiedener Substanzen hemmt, ohne dabei selber O_2 aufzunehmen. SCHENCK deutete diesen Befund als eine direkte Reaktion zwischen dem angeregten Sensibilisator und dem Polyen unter Ausschluß von O_2 oder Zwischenprodukten der sensibilisierten Reaktion mit O_2 . FUJIMORI und LIVINGSTON²⁴ fanden, daß auch Cyclooctatetraen, dessen Spektrum in den sichtbaren Bereich übergreift, metastabiles Chlorophyll inaktivieren kann. Allerdings ist seine Wirksamkeit dabei schwächer als die von O_2 , Carotin und Chinon. Konjugierte Systeme scheinen also allgemein geeignet zu sein, die Anregung fluoreszierender Farbstoffe wie Chlorophyll und Methylenblau durch direkte Reaktion mit dem Sensibilisator zu löschen.

Die hier beschriebenen Versuche können die wesentlich komplizierteren Verhältnisse im Chloroplasten natürlich nur begrenzt reproduzieren. Dennoch läßt sich ein für die Deutung unserer Versuche wichtiges Phänomen, nämlich die Konkurrenz von Carotin und O_2 um die Energie von Chl^* , bei einer *Chlorella*-Mutante auch *in vivo* beobachten. Die vom Chlorophyll sensibilisierte Isomerisierung von Prolycopin und Protetrahydrolycopin tritt in rotem Licht auch bei intakten Zellen vom Stamm 5/520¹⁸ auf und ist hier ebenso sauerstoffempfindlich wie *in vitro*. Da Pflanzencarotinoide in der überwiegenden Mehrzahl in der *all-trans*-Konfiguration anzutreffen sind¹⁵, spielt hier möglicherweise die Instabilität der *cis*-Konfiguration in Gegenwart von belichtetem Chlorophyll eine Rolle.

Zu besonderem Dank bin ich Prof. Dr. H. GAFFRON für die Ermöglichung dieser Arbeit und für anregende Diskussionen verpflichtet.

²⁵ J. R. PLATT, Science [Washington] **129**, 372 [1959].

²⁶ G. O. SCHENCK, Naturwissenschaften **40**, 205 [1953].