

Untersuchungen über die Beteiligung des Sauerstoffs in photosynthetischen Reaktionen mit Hilfe von Hemmstoffen

Von ACHIM TREBST und HERBERT ECK

Aus dem Organisch-chemischen Institut der Technischen Hochschule München

(Z. Naturforsch. 16 b, 455—461 [1961]; eingegangen am 9. Mai 1961)

Hydrogenperoxide formation in the light in isolated chloroplasts is markedly increased upon the addition of KCN, diethyldithiocarbamate and 3-amino-1.2.4-triazol, whereas photophosphorylation is not influenced by these compounds. Catalase activity of chloroplasts is inhibited by KCN, diethyldithiocarbamate and aminotriazol. Since furthermore the oxidation of chlorogenic acid requires light, we assume that the reduced cofactor in oxygen catalyzed photophosphorylation is not reoxidized by phenoloxidase but by a chlorophyll sensitized photooxidation accompanied by H_2O_2 -formation. In the absence of inhibitors the H_2O_2 is decomposed by catalase.

The influence of dichlorophenylmethylurea and *o*-phenanthroline on cyclic photophosphorylation in the absence of oxygen has been investigated. Photophosphorylation catalyzed by Vitamin K or dichlorophenolindophenol is not inhibited provided that the cofactor is in the reduced state at the beginning of the reaction. The finding that indophenols are catalysts of cyclic photophosphorylation without the participation of oxygen explains former results hitherto hard to fit into the known schemes of electrontransport in chloroplasts.

ARNON konnte als erster photosynthetische Phosphorylierungen in isolierten Chloroplasten nachweisen¹. Die lichtabhängige Reduktion von TPN* unter O_2 -Entwicklung ist mit der Bildung von ATP gekoppelt². Weiterhin fand ARNON eine cyclische Photophosphorylierung, in der im Licht in einem cyclischen Elektronentransport mit FMN oder Vitamin K als Cofaktoren ATP gebildet wird³. Er betonte, daß diese Reaktion in Abwesenheit von O_2 verlief⁴. In der letzten Zeit ist das Problem der Beteiligung von O_2 in der cyclischen Photophosphorylierung jedoch erneut aufgeworfen worden. WESSELS⁵, JAGENDORF⁶ und KROGMANN⁷ fanden, daß der Ablauf des Prozesses bei suboptimalen Cofaktorkonzentrationen O_2 erfordert (O_2 -katalysierte cyclische Photophosphorylierung im Gegensatz zur ARNONschen O_2 -unabhängigen Photophosphorylierung).

Wir fanden kürzlich⁸, daß zahlreiche Chinone in

O_2 -katalysierter, aber nur solche Chinone mit einem Redoxpotential kleiner als null in O_2 -unabhängiger Photophosphorylierung wirksam waren. Dies läßt sich so erklären, daß im letzteren Fall das im Licht reduzierte Chinon durch eine Cytochromreduktase, im ersteren durch O_2 oxydiert wird, wobei dies nach WARBURG⁹ durch eine Phenoloxydase-Reaktion oder durch Autoxydation unter H_2O_2 -Bildung erfolgt.

Um die Frage zu klären, wie das Hydrochinon und O_2 in der O_2 -katalysierten Photophosphorylierung miteinander reagieren, untersuchten wir den Einfluß einiger Hemmstoffe von Phenoloxidasen — KCN, DDTC und 3-Amino-1.2.4-triazol.

o-Phenanthrolin und DCMU sind Hemmstoffe der O_2 -Entwicklung in der Photosynthese^{10,11}. Mit Hilfe von DCMU kann zwischen O_2 -unabhängiger und O_2 -katalysierter Photophosphorylierung unterschieden werden, da 10^{-6} -*m*. DCMU nur die Photophosphorylierung in Luft hemmt^{7,8,12}. JAGENDORF¹³ fand

¹ D. I. ARNON, F. R. WHATLEY u. M. B. ALLEN, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **16**, 605 [1955].

* Folgende Abkürzungen wurden benutzt: TPN: Triphosphopyridinnucleotid, DPNH: reduziertes Diphosphopyridinnucleotid, ADP: Adenosindiphosphat, ATP: Adenosin-triphosphat, P: anorganisches Phosphat, FMN: Riboflavinphosphat, DDTC: Diäthylthiocarbamat, DCMU: Dichlorphenyldimethylharnstoff.

² D. I. ARNON, F. R. WHATLEY u. M. B. ALLEN, *Science* [Washington] **127**, 1026 [1958].

³ F. R. WHATLEY, M. B. ALLEN u. D. I. ARNON, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **32**, 32 [1959].

⁴ D. I. ARNON, *Nature* [London] **184**, 10 [1959].

⁵ J. S. C. WESSELS, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **29**, 113 [1958].

⁶ A. T. JAGENDORF u. M. AVRON, *Arch. Biochem. Biophysics* **30**, 246 [1959].

⁷ T. NAKAMOTO, D. K. KROGMANN u. B. VENNESLAND, *J. biol. Chemistry* **234**, 2783 [1959].

⁸ A. TREBST u. H. ECK, *Z. Naturforsch.* **16 b**, 44 [1961].

⁹ O. WARBURG, G. KRIPPFAHL, H. S. GEWITZ u. W. VÖLKER, *Z. Naturforsch.* **14 b**, 712 [1959].

¹⁰ O. WARBURG u. W. LÜTTGENS, *Biokhimiya* **11**, 303 [1946].

¹¹ J. S. C. WESSELS u. R. VAN DER VEEN, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **19**, 548 [1956].

¹² D. I. ARNON, *Light and Life*, Ed. W. D. McELROY u. B. GLASS, The Johns Hopkins Press, Baltimore 1961.

¹³ A. T. JAGENDORF u. M. MARGULIES, *Arch. Biochem. Biophysics* **90**, 184 [1960].

kürzlich, daß cyclische Photophosphorylierung mit Vitamin K durch DCMU gehemmt wird und schloß daraus, daß doch geringe Mengen O_2 für dieses System notwendig seien. Wir untersuchten deshalb die Bedingungen, unter denen eine Photophosphorylierung resistent gegenüber auch sehr hohen Konzentrationen von DCMU und *o*-Phenanthrolin wird und deshalb als O_2 -unabhängig angesehen werden kann.

Methodik

Die Versuche wurden mit „broken chloroplasts“ = „Grana“ von Spinat durchgeführt. Broken chloroplasts (P_{1st}) wurden nach ARNON³ durch Zerreiben von Spinatblättern in 0,35-m. NaCl + 10 Prozent 0,2-m. Trispuffer p_H 8 und Differential-Zentrifugation gewonnen. Die so erhaltenen ganzen Chloroplasten wurden in Wasser aufgebrochen und die „Grana“ hochtourig abzentrifugiert. Die Reaktion wurde in konischen Warburg-Gefäßen von etwa 14 ml Inhalt in einem Warburg-Apparat bei 15 °C durchgeführt. Jedes Gefäß enthielt in einem Gesamtvolumen von 3 ml folgende Substanzen in μ Molen: Trispuffer p_H 8,0 80; Mg^{2+} 5; ADP 10; P 10; broken chloroplasts mit einem Chlorophyllgehalt von 0,2 (in den Versuchen mit Indophenolen 0,3) und die in den Tabellen angegebenen Zusätze. Nachdem die Gefäße mit nachgereinigtem Stickstoff oder Luft aequilibriert waren, wurde 15 min mit 35 000 Lux (Philips-Attralux-Lampen) belichtet. O_2 -Entwicklung oder -Aufnahme wurde manometrisch verfolgt. ATP wurde in einem Aliquot der mit 0,2 ml 20-proz. Trichloressigsäure gestoppten Proben enzymatisch mit Phosphoglycerinsäure, DPNH, Triosephosphatdehydrogenase und Phosphoglyceratkinase durch den dem ATP proportionalen Abfall der Extinktion von DPNH bei 340 m μ gemessen. H_2O_2 wurde durch die Reaktion mit Titansulfat und Messung der Extinktion bei 395 m μ bestimmt.

Ergebnisse

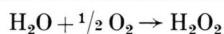
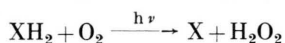
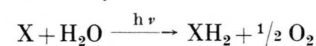
Tab. 1 zeigt die Bildung von ATP und H_2O_2 bei Belichtung von isolierten Chloroplastenfragmenten in Luft mit verschiedenen Cofaktoren, von denen bekannt ist, daß sie in Luft cyclische Photophosphorylierung katalysieren können⁸. Wie die Tab. zeigt, werden bei Belichtung von Grana mit den drei Cofaktoren immer kleine Mengen H_2O_2 gebildet, besonders mit Vitamin K_3 . Der Zusatz von Kaliumcyanid, auch in hoher Konzentration, hat keinen Einfluß auf die ATP-Bildung, in Übereinstimmung mit Versuchen von WARBURG⁹. Dagegen wird die Bildung von H_2O_2 wesentlich erhöht. Ein Einfluß auf die H_2O_2 -Bildung ist noch mit 10^{-5} -m. KCN merkbar. Es zeigen sich keine prinzipiellen Unterschiede zwischen den drei Cofaktoren, der Effekt ist qualitativ derselbe, nur ist die H_2O_2 -Bildung beim Trimethylchinon geringer, wie auch die Photophosphorylierung.

Auch DDTC und Aminotriazol haben dieselbe Wirkung wie KCN. Die ATP-Bildung wird nur unwesentlich beeinflusst (eine etwa 50-proz. Hemmung wird durch DDTC bei Chlorogensäure hervorgerufen), dagegen wird die H_2O_2 -Bildung stark erhöht. Es sind allerdings sehr hohe Konzentrationen von DDTC und Aminotriazol notwendig, um diesen Effekt zu zeigen. DDTC reagiert chemisch mit H_2O_2 ; deshalb ist die intermediäre H_2O_2 -Bildung nur indirekt durch die erhöhte O_2 -Aufnahme zu zeigen. Da im Licht bei der Reduktion des Cofaktors 0,5 Mol O_2 pro Mol Cofaktor gebildet werden und bei der Oxydation des Hydrochinons unter H_2O_2 -Bildung

Cofaktor	0,2 μ Mol Vit. K_3			0,2 μ Mol Trimethylchinon			0,2 μ Mol Chlorogensäure		
Zusätze	μ Atome O aufgenommen	H_2O_2 gebildet	ATP gebildet	μ Atome O aufgenommen	H_2O_2 gebildet	ATP gebildet	μ Atome O aufgenommen	H_2O_2 gebildet	ATP gebildet
—	2,2	2,3	6,1	0,2	0,5	3,3	1,3	1,1	6,2
10^{-3} -m · KCN	7,5	8,5	6,4	3,3	3,6	3,4	6,5	6,5	6,3
10^{-4} -m · KCN	6,2	6,3	6,0	2,2	2,8	3,5	5,2	6,0	7,1
10^{-5} -m · KCN	5,3	4,8	6,0	1,5	1,2	3,4	3,6	3,4	7,2
10^{-6} -m · KCN	2,7	2,1	5,6	0,3	0,5	3,3	1,5	1,2	6,4
10^{-2} -m · DDTC	8,0		5,3	5,0		3,0	3,0		3,5
10^{-3} -m · DDTC	4,2		6,1	1,5		3,5	1,3		3,9
10^{-2} -m · 3-Amino-1,2,4-triazol		4,2	5,5	2,8	2,1	4,0	4,0	4,8	6,1
10^{-3} -m · 3-Amino-1,2,4-triazol		3,7	5,1	1,1	1,1	3,4	3,0	3,5	7,1

Tab. 1. Einfluß von Hemmstoffen auf ATP- und H_2O_2 -Bildung mit verschiedenen Cofaktoren bei Belichtung von Chloroplasten in Luft.

1 Mol O₂ pro Mol Hydrochinon verbraucht wird



ist das Verhältnis von O₂-Aufnahme zur H₂O₂-Bildung 1 μ Atom O pro μ Mol H₂O₂.

Wie die drei in der Tabelle angeführten Cofaktoren verhalten sich zahlreiche substituierte Benzoquinone mit Redoxpotentialen in einem weiten Bereich. Auch Indophenole zeigen gleiches Verhalten, d. h. bei Zusatz der Hemmstoffe ist deutlich eine Erhöhung der H₂O₂-Bildung festzustellen.

Da das Auftreten von H₂O₂ auf einer Katalase-Hemmung beruhen könnte, sind die Eigenschaften der Katalase von Chloroplasten von Interesse. Über die Bedeutung der Katalase in Chloroplasten besteht keine Übereinstimmung. JAGENDORF¹⁴ konnte nur geringe Katalase-Aktivität in gereinigten Chloroplasten nachweisen, während KROGMANN¹⁵ Katalase fand, ihr jedoch keine Funktion im Elektronentransport im Licht zuschreibt. Wie Tab. 2 zeigt, hat unsere Chloroplasten-Präparation deutliche Katalase-Aktivität. Diese Katalase-Aktivität wird nun interessanterweise durch die gleichen Konzentrationen der gleichen Hemmstoffe herabgesetzt, die im Licht (Tab. 1) zur Anhäufung von H₂O₂ führen. So wird sie zu 90% durch 10⁻⁴-m. KCN, 10⁻²-m. DDTC und 10⁻²-m. Aminotriazol gehemmt. Dies unterstützt die Vorstellung, daß diese Hemmstoffe in Chloroplasten nicht eine Phenoloxydase, sondern eine

Katalase hemmen. Käuflische Katalase aus Kaninchenmuskel wurde dagegen durch DDTC und Aminotriazol nicht beeinflusst, vgl. l. c.¹⁶.

Zusätze	Dunkelheit		Licht	
	μ Atome O aufgenommen	H ₂ O ₂ gebildet	μ Atome O aufgenommen	H ₂ O ₂ gebildet
—	0	0	1,6	1,0
10 ⁻³ -m. KCN	0,2	0	6,4	5,8

Tab. 3. Autoxydation von 5 μ Molen Chlorogensäure durch Chloroplasten in Licht und Dunkel in 15 Minuten.

Da eine Phenoloxydase auch im Dunkeln wirksam ist, untersuchten wir die Oxydation von Chlorogensäure im Licht und im Dunkeln. Wie Tab. 3 zeigt, findet im Dunkeln keine O₂-Aufnahme statt. Es ist keine Phenoloxydase oder Autoxydation festzustellen. Im Licht dagegen wird O₂ aufgenommen. Dies wird erst bei Zusatz von KCN, das die Katalase hemmt, deutlich, da sich nun H₂O₂ anreichern kann. Wie vorher ausgeführt, haben sich ohne KCN-Zusatz die Hill-Reaktion und die Photooxydation mit anschließender Zersetzung des H₂O₂ durch Katalase kompensiert und es kann nur eine dem unzerstetzt gebliebenen H₂O₂ entsprechende O₂-Aufnahme gemessen werden. Wie Chlorogensäure verhalten sich auch Hydrochinone, nur daß diese auch im Dunkeln eine vom Redoxpotential abhängige mehr oder weniger starke Autoxydation zeigen, wie WESSELS¹⁷ bereits feststellte. Diese Autoxydation ist jedoch zur Erklärung der hohen Phosphorylierungsraten zu gering.

Weiterhin untersuchten wir den Einfluß von DCMU und o-Phenanthrolin auf die O₂-unabhängige Photophosphorylierung.

Wie Tab. 4 zeigt, ist bei der üblichen Art der Versuchsdurchführung (d. h. alle Zusätze werden vor Versuchsbeginn zusammenpipettiert) die Photophosphorylierung mit Vitamin K₃ sowohl in Stickstoff als auch in Luft durch DCMU gehemmt (Zeile 1 und 2). Dies ist in Übereinstimmung mit den Versuchen von JAGENDORF¹³. Wird jedoch dafür Sorge getragen, daß sich das Vitamin K₃ zu Beginn der Lichtreaktion im reduzierten Zustand befindet, dann ist das Vitamin K-System in Stickstoff auch gegenüber sehr hohen Konzentrationen DCMU unemp-

Zusätze	O ₂ -Entwicklung nach 15 min. Dunkelheit aus 20 μ Molen H ₂ O ₂
—	16,7
10 ⁻³ -m. KCN	1,1
10 ⁻⁴ -m. KCN	2,8
10 ⁻⁵ -m. KCN	9,4
10 ⁻² -m. DDTC	2,6
10 ⁻³ -m. DDTC	13,5
10 ⁻² -m. Aminotriazol	2,3
10 ⁻³ -m. Aminotriazol	6,5

Tab. 2. Einfluß von Hemmstoffen auf die Katalase-Aktivität von Chloroplasten.

¹⁴ A. T. JAGENDORF, Plant Physiol. **30**, 138 [1955].

¹⁵ D. W. KROGMANN, J. biol. Chemistry **235**, 3630 [1960].

¹⁶ E. MARGOLIASH u. A. NOVORODSKY, Biochem. J. **68**, 468 [1958].

¹⁷ J. S. C. WESSELS, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **74**, 832 [1955].

	Zusätze	Cofaktor Gasphase	0,2 μ Mol Vit. K ₃		0,5 μ Mol Vit. K ₃ *		0,1 μ Mol FMN + 10 μ Mole Ascorb. N ₂	0,5 μ Mol Dichlorphenol- indophenol		0,4 μ Mol Trichlor- phenol- indophenol N ₂
			N ₂	Luft	N ₂	Luft		N ₂	Luft	
			μ Mol ATP gebildet							
1	— — —		7,1	5,1	2,8	6,0	7,8	2,7	6,8	2,0
2	10 ⁻⁴ -m · DCMU*		< 0,1	< 0,1	5,1	< 0,1	0,5	< 0,1	< 0,1	0,3
3	10 ⁻⁴ -m · DCMU nach 1 min. Licht**		4,6	0,7			2,3	4,3	1,4	0,6
4	10 ⁻⁴ -m · DCMU + 0,5 μ Mol DPNH***		6,6	0,9				2,3	1,7	2,4
5	10 ⁻⁴ -m · DCMU + 1,0 μ Mol DPNH***							4,6	4,6	3,2
6	10 ⁻⁴ -m · DCMU + 5,0 μ Mole DPNH***		6,5	1,1			1,5	5,3	5,8	3,6
7	10 ⁻⁴ -m · DCMU + 1,0 μ Mol Ascorbat							3,4	2,1	2,8
8	10 ⁻⁴ -m · DCMU + 0,5 μ Mol Na ₂ S ₂ O ₄ ****		4,4	0,1				4,8	1,5	1,7
9	10 ⁻⁴ -m · o-Phenanthrolin*		5,0	0,2	6,6	0,7	1,2	4,7	0,1	2,9
10	10 ⁻⁴ -m · o-Phenanthrolin nach 1 Min. Licht**						2,3	5,6	3,0	3,5

Tab. 4. Einfluß von DCMU und o-Phenanthrolin auf die ATP-Bildung mit verschiedenen Cofaktoren bei Belichtung von Chloroplasten. * Zusatz kurz vor der Belichtung. ** Zusatz erst nach 1 Min. Belichtung des Systems. *** Gefäß enthielt Chloroplastenextrakt, entsprechend einem Chlorophyll-Gehalt von 0,5 mg. **** Cofaktor vor Versuchsbeginn mit Dithionit versetzt.

findlich. Diese Reduktion des Vitamin K₃ vor Zugabe des Hemmstoffes kann, wie Tab. 4 zeigt, chemisch durch Dithionit (Zeile 8), enzymatisch durch DPNH und die im Chloroplastenextrakt vorhandene Diaphorase (Zeile 4–6) oder durch einminütige Belichtung des Systems in Abwesenheit des Hemmstoffes (Zeile 3) geschehen. Sowohl Dithionit als auch DPNH sind dabei nur in einer dem Vitamin K₃ äquivalenten Menge notwendig. o-Phenanthrolin hemmt das Vitamin K₃-System in Stickstoff nicht (Zeile 9). In Luft dagegen wird die Phosphorylierung mit Vitamin K₃ immer durch DCMU oder o-Phenanthrolin gehemmt. Noch deutlicher wird es beim Vitamin K₅ (2-Methyl-4-aminonaphthol), das sich bereits im reduzierten Zustand befindet. Das Vitamin K₅-System wird unter Stickstoff nicht durch DCMU oder o-Phenanthrolin gehemmt, wenn man darauf achtet, daß sich das Vitamin K₅ nicht bereits bis zum Versuchsbeginn aufoxydiert hat. Unter diesen Bedingungen (Zeile 2) ist die Phosphorylierung sogar besser, als mit Vitamin K₅ allein (Zeile 1). In Luft findet bei Zusatz der Hemmstoffe keine Phosphorylierung statt.

Es zeigt sich also, daß Vitamin K Cofaktor einer O₂-unabhängigen Photophosphorylierung ist und

daß diese durch DCMU und o-Phenanthrolin nicht gehemmt wird.

Die Ergebnisse mit FMN als Cofaktor zeigen, daß bei gleicher Versuchsdurchführung (vorherige Reduktion des Cofaktors) keine Resistenz gegenüber DCMU oder o-Phenanthrolin erreicht wird. Bereits ARNON hat darauf hingewiesen, daß die Photophosphorylierung mit FMN als Cofaktor zum Unterschied zu der mit Vitamin K₃ durch o-Phenanthrolin gehemmt wird³. Das FMN-System scheint also, wie von anderen Autoren bereits angenommen^{7, 13}, nur bei Beteiligung geringer Mengen O₂ zu phosphorylieren. Allerdings ist die Hemmung nicht vollständig und es kann nicht ausgeschlossen werden, daß das extrem oxydationsempfindliche reduzierte FMN in unseren Versuchen bereits durch geringe O₂-Mengen wieder aufoxydiert war.

Tab. 4 zeigt weiterhin, daß sich Dichlorphenolindophenol wie Vitamin K₃ verhält. Denn Dichlorphenolindophenol ist ein vorzüglicher Cofaktor einer Photophosphorylierung in Stickstoff, wenn dafür Sorge getragen wird, daß es sich zu Beginn der Reaktion im reduzierten Zustand befindet. Dies kann wieder chemisch durch Dithionit (Zeile 8) oder Ascorbinsäure (Zeile 7), enzymatisch durch DPNH

(Zeile 4–6) oder durch kurzes Belichten vor Zugabe des Hemmstoffes (Zeile 3) geschehen. Diese Photophosphorylierung wird dann nicht durch DCMU gehemmt und ist sogar höher als der Bezugswert mit Dichlorphenolindophenol allein (Zeile 1). In Luft ist die Hemmung der Photophosphorylierung durch DCMU oder *o*-Phenanthrolin teilweise aufhebbar (im Gegensatz zum Vitamin K-System). Dies läßt sich durch eine geringere Photooxydations-Empfindlichkeit der reduzierten Indophenole deuten.

Trichlorphenolindophenol verhält sich qualitativ wie Dichlorphenolindophenol. Doch sind die Phosphorylierungen, wie die Tab. zeigt, nicht so hoch und deshalb die Verhältnisse nicht so deutlich.

Nach Tab. 4 sind also Vitamin K und zwei Indophenole Cofaktoren einer cyclischen Photophosphorylierung in Stickstoff. Diese kann dann durch die Hemmstoffe der Hill-Reaktion DCMU und *o*-Phenanthrolin nicht gehemmt werden, wenn die Cofaktoren zu Beginn der Belichtung reduziert sind.

Wir fanden, daß sich Dichlorphenyldimethylharnstoff (DCMU) wie Chlorphenyldimethylharnstoff (CMU) verhält. *o*-Phenanthrolin zeigt kleine Unterschiede gegenüber den Harnstoffderivaten (s. Tab. 4). Die Reduktion des Cofaktors vor Versuchsbeginn ist nicht notwendig; offensichtlich wird die Hill-Reaktion nicht so wirkungsvoll gehemmt wie durch die CMU-Derivate.

Diskussion

Die Bildung von H_2O_2 bei Belichtung von Chloroplasten wurde zuerst von MEHLER beobachtet¹⁸. Diese „Mehler-Reaktion“ wurde zunächst als Hill-Reaktion mit Sauerstoff als Wasserstoffacceptor gedeutet. MEHLER¹⁹ fand bereits die katalytische Wirkung von Benzochinon und GOOD und HILL²⁰ diskutierten, ob die H_2O_2 -Bildung durch Autoxydation einer im Licht reduzierten chinoiden Verbindung zu verstehen sei. WARBURG⁹ zeigte, daß H_2O_2 in Chloroplasten bei Zusatz von KCN auftritt. Während in Versuchen von WESSELS⁵ die Photophosphorylierung in Luft zu etwa 50% durch KCN gehemmt wurde, fand WARBURG⁹ keine Hemmung der ATP-Bildung durch KCN bei höheren O_2 -Drucken. WAR-

BURG schloß daraus⁹, daß eine für die Oxydation des Hydrochinons verantwortliche Phenoloxydase durch KCN gehemmt wird, bei hohen O_2 -Drucken jedoch eine Autoxydation des Hydrochinons unter H_2O_2 -Bildung eintreten kann, so daß wieder Chinon für die mit einer ATP-Bildung gekoppelten Reduktion des Chinons zur Verfügung steht.

Auch unsere Ergebnisse zeigen, daß KCN kein Hemmstoff der O_2 -katalysierten Photophosphorylierung ist. Daß KCN jedoch in die Reaktionen der Reoxydation des reduzierten Cofaktors eingreift, kann man daran erkennen, daß sich unter dem Einfluß des Hemmstoffes erhebliche Mengen H_2O_2 anhäufen. Gleichen Effekt wie KCN haben DDTC und Aminotriazol. Diese Substanzen sind Hemmstoffe von Phenoloxidasen²¹. Während jedoch $10^{-3}m$. DDTC zur Hemmung eines Cu-Enzyms ausreichen, finden wir erst bei $10^{-2}m$. DDTC eine deutliche Erhöhung der H_2O_2 -Menge. Es erscheint uns deshalb nicht wahrscheinlich, daß die Reoxydation des Hydrochinons in der O_2 -abhängigen Photophosphorylierung durch eine Phenoloxydase erfolgt. Dagegen spricht ebenfalls, daß im Dunkeln nur eine sehr geringe Autoxydation von Chlorogensäure oder Hydrochinonen erfolgt. Zur Oxydation von Chlorogensäure durch Chloroplasten ist Licht erforderlich. Dies war ebenso der Fall in Versuchen von WESSELS¹⁷, der wahrscheinlich machen konnte, daß die Ascorbinsäure-Oxydation in Chloroplasten eine chlorophyllsensibilisierte Photooxydation ist. Auch unsere Ergebnisse lassen sich zwanglos so deuten, daß die reduzierten Cofaktoren der cyclischen Photophosphorylierung in Luft nicht enzymatisch, sondern durch eine Photooxydation autoxydiert werden. Das dabei entstehende H_2O_2 wird durch Katalase zerlegt. Erst bei Zusatz von KCN häuft sich H_2O_2 an. Damit steht in Übereinstimmung, daß die Katalase-Aktivität der Chloroplasten durch die gleiche Konzentration der gleichen Hemmstoffe (KCN, DDTC und Aminotriazol) gehemmt wird, die auch zur Anhäufung von H_2O_2 im Licht führen. Die O_2 -katalysierte cyclische Photophosphorylierung wäre demnach ein Artefakt.

Als physiologischer Cofaktor käme dann nur noch der in Frage, der O_2 -unabhängige Photophosphorylierung katalysiert.

¹⁸ A. M. MEHLER, Arch. Biochem. Biophysics **33**, 65 [1951].

¹⁹ A. M. MEHLER, Arch. Biochem. Biophysics **34**, 339 [1951].

²⁰ N. GOOD u. R. HILL, Arch. Biochem. Biophysics **57**, 355 [1955].

²¹ P. CASTELFRANCE, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **41**, 485 [1960].

Ein Cofaktor einer O_2 -unabhängigen Photophosphorylierung darf auch durch hohe Konzentrationen von DCMU oder *o*-Phenanthrolin nicht gehemmt werden. Denn diese sind Hemmstoffe der O_2 -Entwicklung, von der die cyclische Photophosphorylierung unabhängig ist. Beim Vitamin K und beim FMN im Gegensatz zum Methylphenazonium-methosulfat wurden deshalb Zweifel geäußert, ob sie eine O_2 -unabhängige Photophosphorylierung katalysieren können, da diese durch DCMU gehemmt wurde¹³.

Wir konnten jedoch zeigen (Tab. 4), daß DCMU oder *o*-Phenanthrolin die cyclische Photophosphorylierung mit Vitamin K nicht hemmen, wenn sich das Vitamin K zu Beginn der Reaktion im reduzierten Zustand befindet. Dies kann dadurch erreicht werden, daß Vitamin K_3 kurz vorher chemisch oder enzymatisch reduziert oder daß Vitamin K_5 (als Aminophenol bereits im reduzierten Zustand) verwandt wird. Daraus folgt, daß Vitamin K wirklich Cofaktor einer O_2 -unabhängigen cyclischen Photophosphorylierung ist.

Daß dagegen bei Zugabe des Cofaktors in der oxydierten Form eine Hemmung durch DCMU zu beobachten ist, läßt sich einfach so erklären, daß zum Start der cyclischen Photophosphorylierung der Cofaktor erst in einer Hill-Reaktion reduziert werden muß. Diese Hill-Reaktion wird durch DCMU gehemmt. Befindet sich der Cofaktor bereits in der reduzierten Form, ist die Hill-Reaktion zum Start nicht notwendig und das System ist unter Stickstoff resistent gegenüber Hemmstoffen der Hill-Reaktion. Bei Photophosphorylierungen in Luft erfolgt die Reoxydation des reduzierten Cofaktors durch Sauerstoff und die Reduktion des Cofaktors während der ganzen Versuchszeit durch die Hill-Reaktion. Deshalb ist die Photophosphorylierung in Luft immer sensitiv gegenüber Hemmstoffen der Hill-Reaktion.

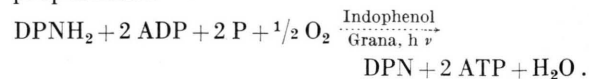
Die Indophenole nehmen eine Sonderstellung unter den zahlreichen Redoxsystemen ein, die man mit Chloroplasten ausgetestet hat. Die Hill-Reaktion mit Indophenolen als Elektronenacceptor ist nicht mit einer Phosphorylierung gekoppelt²², wie das bei anderen Hill-Reagentien der Fall ist. Andererseits können reduzierte Indophenole als Elektronendonatoren dienen. So konnte JAGENDORF²³

zeigen, daß die Hemmung der Reduktion von TPN durch DCMU durch Indophenol/Ascorbinsäure aufgehoben werden kann. VERNON²⁴ fand kürzlich, daß in gealterten Chloroplasten-Präparationen, die keinen O_2 mehr entwickeln können, Indophenol/Ascorbinsäure an Stelle einer Hill-Reaktion im Licht TPN reduzieren können. Obwohl aus diesen Eigenschaften einiger Indophenole, nämlich daß sie sowohl Elektronenacceptor als auch Donator in der Photosynthese sein können, geschlossen werden muß, daß sie Cofaktoren einer O_2 -unabhängigen Photophosphorylierung sein müßten, konnte bisher aber nur eine Photophosphorylierung in Luft nachgewiesen werden¹⁵.

Wir konnten jedoch zeigen, daß Dichlorphenol-indophenol auch unter Stickstoff Photophosphorylierung katalysieren kann. Denn wie Tab. 4 erläutert, zeigt Dichlorphenolindophenol ähnliches Verhalten wie Vitamin K_3 . Befindet sich Dichlorphenolindophenol zu Beginn der Reaktion im reduzierten Zustand, so ist es auch in Stickstoff ein vorzüglicher Cofaktor einer cyclischen Photophosphorylierung und dieses System kann durch DCMU oder *o*-Phenanthrolin nicht gehemmt werden.

Der Hemmstoff stimuliert unter diesen Bedingungen sogar die ATP-Bildung, denn es wurde mehr gebildet als in der Kontrolle. Dies ist ebenso der Fall beim Vitamin K_5 und wie JAGENDORF⁶ fand, auch beim Methylphenazonium-methosulfat.

Der Befund, daß Dichlorphenolindophenol auch anaerob cyclische Photophosphorylierung katalysieren kann, scheint uns Ergebnisse von KROGMANN²⁵ zu erklären, die mit den bisher entwickelten Vorstellungen des Elektronentransportes in der Photosynthese nicht vereinbar waren. KROGMANN hatte eine oxydative Photophosphorylierung postuliert²⁵. Hierbei sollte ein reduziertes Indophenol in einer lichtabhängigen Reaktion durch Sauerstoff oxydiert werden und diese mit einer ATP-Bildung gekoppelt sein. Trichlorphenolindophenol wurde in katalytischen Mengen zugesetzt und durch Ascorbinsäure oder DPNH reduziert gehalten. Nach KROGMANN waren der Sauerstoffverbrauch der DPNH und ATP-Menge proportional.



²² D. W. KROGMANN u. A. T. JAGENDORF, *Plant Physiol.* **34**, 277 [1959].

²³ A. T. JAGENDORF, *Fed. Proc.* **18**, 974 [1959].

²⁴ L. P. VERNON u. W. S. ZAUGG, *J. biol. Chemistry* **235**, 2728 [1960].

²⁵ D. W. KROGMANN u. B. VENNESLAND, *J. biol. Chemistry* **234**, 2205 [1959].

Diese Reaktion konnte durch DCMU nicht gehemmt werden und war auch in einer Chloroplasten-Präparation möglich, die keine Hill-Reaktion mehr durchführen konnte.

Unglücklicherweise wurden die Namen zweier Prozesse — oxydative Photophosphorylierung und O_2 -katalysierte Photophosphorylierung — öfters nicht klar getrennt. Eine Arbeit von KROGMANN¹⁵ über oxydative Photophosphorylierung befaßt sich tatsächlich mit O_2 -katalysierter Photophosphorylierung.

Wir glauben, daß die Ergebnisse von KROGMANN²⁵ als eine cyclische Photophosphorylierung mit Indophenol als Cofaktor zu erklären sind, nachdem das Indophenol — da die Hill-Reaktion unter KROGMANN'S Bedingungen nicht ablaufen konnte — chemisch durch Ascorbinsäure oder enzymatisch durch DPNH reduziert worden war. Wie unsere Versuche zeigen, ist zur ATP-Bildung mit Dichlorphenolindophenol als Cofaktor kein O_2 und zur Reduktion des Indophenols bei Anwesenheit von DCMU nur eine dem Indophenol äquivalente Menge DPNH, Dithionit oder Ascorbinsäure notwendig. Es zeigt sich keine Proportionalität zwischen Reduktionsmittel und gebildetem ATP. In Luft sind allerdings mehr als äquivalente Mengen Reduktionsmittel nötig, da die chlorophyll-sensibilisierte Photooxydation kompensiert werden muß. Auch in der Arbeit von KROGMANN²⁵ steht die O_2 -Aufnahme in keinem Zusammenhang mit der DPNH-Oxydation. Zweifel an der Interpretation der Ergebnisse im

Sinne einer oxydativen Photophosphorylierung und damit einer neuartigen Reaktion sind bereits von ARNON¹² und JAGENDORF¹³ geäußert worden.

Die Indophenole stellen somit eine neue Klasse von Cofaktoren der cyclischen Photophosphorylierung dar. Wegen ihres höheren Redoxpotentials gegenüber dem der Vitamin K-Derivate und anderer bisher bekannter Cofaktoren, sollte man annehmen, daß diese Indophenole an einer anderen Stelle des cyclischen Elektronentransportes eingreifen, etwa beim Cytochrom f.

Mit dieser Vorstellung sind die Ergebnisse von JAGENDORF²³ und von VERNON²⁴ über die Reduktion von TPN durch Indophenol/Ascorbinsäure gut vereinbar. Sie erklären jedoch nicht, weshalb die Reduktion der Indophenole nicht mit einer ATP-Bildung gekoppelt ist²². Bei unseren Versuchen zeigte sich jedoch deutlich, daß immer dann, wenn im Gefäß noch die blaue Farbe des oxydierten Indophenols zu erkennen war, keine Phosphorylierung stattfand. Man könnte also an eine Hemmung durch den oxydierten Farbstoff denken. Aus der Entkopplung der Reduktion der Indophenole hat ARNON kürzlich auf eine zweite nicht gekoppelte Lichtreaktion geschlossen²⁶.

Wir sind Herrn Professor Dr. F. WEYGAND für seine Unterstützung und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für Sachbeihilfen dankbar.

²⁶ M. LOSADA, F. R. WHATLEY u. D. I. ARNON, *Nature* [London] **190**, 606 [1961].

Die Identifizierung zweier im Tenebriokot und in Hefe vorkommender Substanzen mit Juvenilhormonwirkung

VON PETER SCHMIALEK

Aus dem Physiol.-chemischen Institut der Freien Universität Berlin

(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. SCHÜTTE)

(Z. Naturforsch. **16 b**, 461—464 [1961]; eingegangen am 6. Februar 1961)

Aus Hefe und Tenebriokot wurde durch chromatographische Reinigung eine Fraktion mit starker Juvenilhormonwirkung erhalten. Das chemische und chromatographische Verhalten der Aktivität sprach dafür, daß die hormonale Wirksamkeit hauptsächlich auf dem Gehalt an Farnesol und Farnesal beruhte. Synthetischer Farnesol und Farnesal rufen nach Injektion in Insekten *Corpus allatum*-Hormon-Wirkungen hervor.

Das von den Corpora allata der Insekten sezernierte Juvenilhormon (*Corpus allatum*-Hormon, Neotenin) hält, wie WIGGLESWORTH¹ zeigte, den Lar-

vencharakter des wachsenden Insekts aufrecht. Die ersten Extrakte mit Hormonwirkung erhielt WILLIAMS² aus Hinterleibern von Wildseidenspinnern.

¹ V. B. WIGGLESWORTH, *Quart. J. micr. Sci.* **77**, 191 [1934].

² C. M. WILLIAMS, *Nature* [London] **178**, 212 [1956].