Die Bestimmung des genetisch fixierten Stoffwechselblockes einer Photosynthese-Mutante von *Vicia faba*

Von ULRICH HEBER und WERNER GOTTSCHALK

Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn

(Z. Naturforschg. **18 b**, 36—44 [1963]; eingegangen am 13. August 1962)

The genetic and biochemical properties of a mutant of *Vicia faba* which has a defect in photosynthesis have been investigated. The defect is caused by the mutation of one gene. This gene controls a factor involved in the reduction of TPN*. The mutant is unable, therefore, to reduce TPN. Since isolated chloroplasts of the mutant are still capable of photochemically reducing Hill-reagents, such as 2,6-dichlorophenolindophenol and ferricyanide, with concomitant oxygen evolution, and of synthesizing ATP from ADP and P in a cyclic type of photophosphorylation, it is concluded that a considerable part of the electron transport chain is not affected. Soluble factors including photosynthetic pyridine nucleotide reductase are not lacking in the mutant. Therefore, the defect must be located at the end of the electron transport chain, which connects TPN reduction with the electron flow from excited chlorophyll a.

From the results we suggest that in the lamellae structure of chloroplasts there exists an insoluble factor, which is necessary for the transfer of electrons or hydrogen from chlorophyll a to TPN without itself being involved in the cyclic electron flow of photophosphorylation or the light dependent reduction of ferricyanide.

Die biochemische Bearbeitung genabhängiger Prozesse hat gezeigt, daß die Biosynthesen des Zellstoffwechsels auf der Basis von Genwirkketten ablaufen^{1,2}. Theoretisch sollte es möglich sein, die Genabhängigkeit des Chemismus der Photosynthese auf ähnliche Weise zu untersuchen. Es bereitet heute keine Schwierigkeiten mehr, von günstigen Objekten höherer Pflanzen innerhalb weniger Jahre umfangreiche Mutantensortimente aufzubauen. Da der Gesamtkomplex der Photosynthese aus einer ganzen Kette von Reaktionen besteht, wird eine größere Anzahl verschiedener Gene des Genoms an seiner Steuerung beteiligt sein. Es ist daher zu erwarten, daß sich innerhalb eines Sortimentes von einigen hundert Mutanten eine beträchtliche Anzahl von Genotypen mit Photosynthese-Defekten befindet. Trotzdem sind bisher nur wenige Untersuchungen in dieser Richtung vorgenommen worden. Unsere Befunde, die an einer Spontan-Mutante von *Vicia faba* erhalten wurden, zeigen jedoch, daß auch die Photosynthese der höheren Pflanze einer genphysiologischen Bearbeitung zugänglich ist und daß darüber hinaus die Untersuchung von Mutanten Aussagen über den Mechanismus der Photosynthese erlaubt.

Morphologische und genetische Verhältnisse der Mutante

Bei Nachbau eines aus dem Hindukusch stammenden Genotypengemischs von *Vicia faba* ssp. minor* spaltete neben anderen Mutationstypen eine Letalmutante heraus, die bei normaler Freilandaufzucht bereits nach Entwicklung von 3 bis 4 Laubblättern abstirbt. Der Absterbeprozess wird durch den degenerativen Verfall ganzer Gewebekomplexe des Mesophylls von den Rändern der Fiederspreiten her eingeleitet und schreitet vornehmlich bei ansteigenden Temperaturen unter Turgeszenzverlust der Pflanzen rasch fort. Bei Anzucht unter niedrigen Lichtintensitäten — etwa an stark beschatteten Standorten oder im Gewächshaus — sind die Mutanten morphologisch nicht zuverlässig von der Normalform zu unterscheiden, während sie bei hoher Lichtintensität heller sind als die Normalform. Im Warburg-Versuch sind sie jedoch immer eindeutig identifizierbar, da sie im Gegensatz zu Kontrollpflanzen auch bei Belichtung Sauerstoff aufnehmen. Die Mutante ist offenbar der Gruppe der relativ seltenen photolabilen Genotypen zuzuordnen,

* Folgende Abkürzungen werden benutzt: TPN Triphosphopyridinnucleotid, TPNH reduziertes Triphosphopyridinnucleotid, DPNH reduziertes Diphosphopyridinnucleotid, AMP Adenosinmonophosphat, ADP Adenosindiphosphat, ATP Adenosintriphosphat, P anorg. Phosphat, PGS Phosphoglycerinsäure, TRIS Tris(hydroxymethyl)aminomethan.

¹ A. BUTENANDT, Naturwissenschaften **40**, 91 [1953].

² G. W. BEADLE, Science [Washington] **129**, 1715 [1959].

* Dem Direktor des Instituts für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Universität Göttingen, Herrn Prof. Dr. A. SCHEIBE, danken wir sehr für die Überlassung des Materials.

deren Chlorophyll bei starker Insolation infolge Photooxydation abgebaut wird. Die Ergebnisse der biochemischen Untersuchung zeigen jedoch, daß die photooxydativen Prozesse nicht als die Ursache der Letalität anzusehen sind.

Lichtmikroskopisch sind an der Chloroplastenstruktur geringe Unterschiede zwischen Mutante und Normalform feststellbar. Bei der Mehrzahl der untersuchten isolierten Plastiden der Mutante war die Granastruktur kaum erkennbar; aus den Befunden kann jedoch generell auf das Vorhandensein von Grana geschlossen werden. Im gequollenen Zustand zeigten die Plastiden dieses Genotypus eine starke Vergrößerung ihrer Lamellenstruktur, die bei der Normalform in nicht so hohem Grade beobachtet werden konnte. Nähere Aussagen über die Strukturunterschiede der Chloroplasten beider Genotypen können jedoch erst nach einer elektronenmikroskopischen Bearbeitung des Materials gemacht werden.

Infolge der Letalität der Mutante konnte die genetische Bearbeitung des mutierten Gens nicht auf der Basis der Kreuzungsanalyse vorgenommen werden. Es wurden hierzu vielmehr phänotypisch normale Pflanzen aus spaltenden Familien, die erwartungsgemäß ein Gemisch homozygot normaler und heterozygoter Individuen darstellen, selbstbestäubt. Auf diese Weise erhielten wir im Verlaufe von 3 Generationen insgesamt 30 spaltende Familien mit einer Gesamtpaltung von 464 normal : 149 mutiert. Das entspricht einem Mutantenanteil von 24,3 Prozent. Dieser Wert liegt eng am Erwartungswert für eine 3 : 1-Spaltung (459,75 : 153,25); die Abweichung erwies sich nach Anwendung des χ^2 -Testes als nicht signifikant. Der Homogenitätstest erbrachte für das Gesamtmaterial einen statistisch unerwartet hohen Grad von Homogenität ($0,99 < P < 0,999$). Das mutierte Gen zeigt also einen klaren monohybriden Erbgang. Die in den folgenden Abschnitten dargestellten biochemischen Verhältnisse der Mutante sind folglich mit Sicherheit auf die Wirkung eines einzigen rezessiven Gens zurückzuführen.

Methodik

Es wurden Chloroplasten der Mutante und der Normalform isoliert, indem frische Blätter mit etwas Sand und der fünffachen Menge Pufferlösung bei 2 °C 30 bis 60 sec im Mörser verrieben wurden. Die Pufferlösung enthielt 0,5-m. Saccharose, 0,1-m. Phosphat, 0,01-m. KCl und 0,01-m. Äthylendiamintetraacetat sowie 0,001-m. Cystein bei pH 8,0. Beim Verreiben sank

der pH -Wert etwa auf 7,5. Das Homogenisat wurde durch ein Tuch gepreßt, das Filtrat 5 min bei 200 g und nach Dekantieren vom Rückstand 12 min bei 1000 g in der Kälte zentrifugiert. Der dabei anfallende Rückstand besteht zum größten Teil aus Chloroplasten. Zur Messung der Hill-Reaktion mit 2,6-Dichlorphenol-indophenol wurde bisweilen auch auf eine Isolierung intakter Chloroplasten verzichtet. Im oben angegebenen Medium wurde dann Blattmaterial im Bühler-Homogenisator 2 min zerschlagen und die photochemisch aktive Grana-Fraktion nach Abtrennen größerer Partikel bei 200 g 12 min bei 15 000 g sedimentiert. Die Chloroplasten- bzw. Granafraktionen wurden in wenig TRIS-Puffer aufgenommen und sofort zur Untersuchung verwandt.

Die Bedingungen für manometrische Photosyntheseversuche, für die Messung des photosynthetischen Einbaues von $^{14}CO_2$ in Blätter oder in isolierte Chloroplasten sowie für die Bestimmung der Photophosphorylierung und von Photoreduktions-Reaktionen sind in der Legende zu den jeweiligen Tabellen angegeben. Alle Reaktionen wurden bei 20 °C durchgeführt.

Biochemische Befunde an Mutante und Normalform

Die Individuen des verwendeten Mutationstypus sterben regelmäßig nach Ausbildung von 3 bis 4 Blättern ab, zu einem Zeitpunkt also, in dem der wesentlichste Teil der in den Kotyledonen deponierten Reservestoffe aufgebraucht sein dürfte. Da die Bereitstellung der für die Atmung notwendigen Substanzen bei autotrophen Pflanzen durch die

Abb. 1. Sauerstoffabgabe bzw. -verbrauch von Blattstücken einer Normalpflanze und einer Mutante im Licht und im Dunkeln. Bedingungen: Warburg VL der Fa. Braun/Melsungen; im Hauptraum von Warburg-Gefäßen 4 ml $m/10-Na_2CO_3/NaHCO_3$ 1/9, im Einsatz ca. 100 mg Blattgewebe.

Photosynthese garantiert wird, lag die Annahme nahe, daß die Letalität unserer Mutante auf einem Mangel an Atmungsmaterial beruht. Die Prüfung dieser Hypothese mit Hilfe manometrischer Versuche zeigte in der Tat, daß die Pflanzen zwar normal atmen, jedoch nicht in nennenswertem Umfang zur Photosynthese befähigt sind. In Abb. 1 ist die Sauerstoffbilanz von normalem und mutiertem Blattgewebe gleichalter Blätter graphisch dargestellt. Die Normalform gibt im Licht erhebliche Sauerstoffmengen ab, assimiliert also — unter der Annahme eines Assimilationsquotienten von 1 — beträchtlich mehr CO_2 , als durch die Atmung ausgeschieden wird. Bei der Mutante hingegen ist der Sauerstoffverbrauch auch im Licht kaum kleiner als bei Dunkelheit; es wird folglich auch im Licht CO_2 ausgeschieden. Die Assimilation kann also, soweit sie überhaupt stattfindet, die Atmung nicht kompensieren; die Mutante verhungert offenbar infolge eines Defektes im Mechanismus der Photosynthese.

Zur weiteren Bearbeitung des Problems mußte versucht werden, den Gesamtablauf der Photosynthese experimentell in einzelne Teilschritte zu zerlegen, um die Störung innerhalb des Reaktionsablaufs zu lokalisieren. Hierzu wurden folgende Fragestellungen geprüft:

Ist die Pigmentzusammensetzung der Mutante gestört?

Ist die CO_2 -Assimilation direkt oder nur indirekt über die Bereitstellung von ATP oder TPNH betroffen?

Für den Fall einer Störung des Elektronentransportes, der zur lichtabhängigen Bildung von ATP und TPNH führt, wurden noch folgende Fragen behandelt:

Wird die Hill-Reaktion von der Mutante durchgeführt?

Ist das Enzymsystem, das die photochemische Sauerstoffentwicklung katalysiert, intakt?

Kann die Mutante im Licht aus ADP und Phosphat ATP bilden?

Wird TPN im Licht reduziert?

Die Antwort auf die angeführten Fragen erlaubt eine Lokalisation des Defektes, wie im folgenden weiter ausgeführt wird.

1. Die Pigment-Zusammensetzung der beiden Genotypen

Es wurde bereits erwähnt, daß die Mutante bei Anzucht unter starker Lichteinstrahlung heller ist als die Normalform. Jedoch ist für andere Objekte bekannt, daß Genotypen mit außerordentlich niedrigen Chlorophyllmengen noch zur ungestörten ontogenetischen Entwicklung befähigt sind³⁻⁵. Es ist daher nicht zu erwarten, daß die Letalität der mutierten Gens mit diesen Störungen in Verbindung steht. Tatsächlich zeigt sich, daß im Pigmenthaushalt von Mutante und Normalform keine grundsätzlichen Unterschiede bestehen. Das Gesamtchlorophyll wurde nach ARNON⁶, das Verhältnis der Chlorophylle a und b nach BAUER⁷ bestimmt, während Carotinoide nach NYBOM⁸ ermittelt wurden. Bei Anzucht unter normalen Freilandbedingungen variierte der Chlorophyllgehalt verschiedener Individuen der Mutante zwischen 0,5 und 0,8%, der Normalform von 0,9 bis 1,1% des Trockengewichtes. Bei Schattenpflanzen ließen sich zwischen beiden Genotypen keine Unterschiede feststellen. Auch die Spektren der Chlorophylle a und b waren nach Trennung der Farbstoffe durch Säulenchromatographie an Zucker bei beiden Formen identisch. Das gegenseitige Mengenverhältnis der Chlorophylle ist in Tab. 1 zusammen-

Nr. der Pflanze	Mutante	Normalpflanze
1	3,53	2,60
2	3,50	2,54
3	2,71	2,97
4	2,76	2,80
5	3,69	2,60
6	2,12	2,55
7	2,83	
8	2,51	
9	3,11	
10	3,39	
Mittelwert:	$3,02 \pm 0,16$	$2,68 \pm 0,07$

Tab. 1. Das Verhältnis von Chlorophyll a : b bei Mutante und Normalform.

gestellt. Die Mittelwerte der beiden Formen unterscheiden sich zwar um etwa 10%; aus der Prüfung der Befunde mit Hilfe des Wilcoxon-Tests ergibt sich jedoch, daß die Differenzen der Einzelwerte noch im Zufallsbereich liegen ($P > 5\%$). Da auch hinsichtlich der Carotinoide keine Unter-

³ C. CORRENS, S.-B. preuß. Akad. Wiss. physik.-math. Kl. **34**, 585 [1919].

⁴ M. DEMEREC, Cold Spring Harbor Sympos. quantit. Biol. **3**, 80 [1935].

⁵ W. GOTTSCHALK, Bot. Studien 1963, im Druck.

⁶ D. I. ARNON, Plant Physiol. **24**, 1 [1949].

⁷ A. BAUER, Planta **51**, 84 [1958].

⁸ N. NYBOM, Hereditas **41**, 483 [1955].

schiede zwischen den beiden Genotypen feststellbar waren, ist der Defekt der Mutante mit Sicherheit nicht auf Störungen im Pigmenthaushalt zurückzuführen.

2. Die Assimilation von CO_2

Die Blockierung einer Reaktion innerhalb einer Reaktionskette führt zur Anhäufung des vor dem Block gebildeten Intermediärproduktes. Die Anhäufung eines bestimmten Zwischenproduktes der Photosynthese könnte also Hinweise auf die Natur des Defektes in der Mutante geben. Wir fütterten daher Blätter von normalen und mutierten Pflanzen mit $^{14}\text{CO}_2$ und bestimmten den Einbau des markierten Kohlenstoffs in Photosyntheseprodukte. Mit Hilfe dieser Methode ist es darüber hinaus noch möglich, die Assimilationsintensität der beiden Genotypen, die in den eingangs erwähnten Warburg-Versuchen nur indirekt über die Sauerstoffbilanz erschlossen werden konnte, direkt zu vergleichen. Aus Tab. 2 ist ersichtlich, daß die Assimilation

Genotypus	$^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung in $\mu\text{Mol/mg Chlorophyll} \cdot \text{Stde.}$		
	im Dunkeln	im Licht a	im Licht b
Normalpflanze 1	0,54	82,0	34,4
Normalpflanze 2	0,35	53,4	37,0
Mutante 1	0,34	0,85	0,84
Mutante 2	0,32	0,99	0,90
Mutante 3	0,34	0,88	1,90
Mutante 4	0,31	0,88	0,90

Tab. 2. CO_2 -Fixierung von Mutante und Normalform. Bedingungen: $^{14}\text{CO}_2$ wurde bei 20°C in Glasgefäßen von 100 ml Inhalt aus 6 mg $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ entwickelt. Belichtung mit zwei 200-W-Lampen unter Kühlung. Abtöten der Blätter in heißem Alkohol nach 4 min (Licht) bzw. 10 min (Dunkel). Bestimmung der CO_2 -Fixierung nach CALVIN^{8a}. Berechnung der Einbauraten aus der spez. Aktivität des eingesetzten $^{14}\text{CO}_2$. a = CO_2 -Zugabe während kontinuierlicher Belichtung. b = CO_2 -Zugabe zugleich mit Lichtbeginn.

der Mutante im Licht etwa 2 Zehnerpotenzen unter derjenigen der Normalform liegt. Im Dunkeln hingegen lassen sich hinsichtlich des Einbaues von CO_2 zwischen den beiden Genotypen keine größeren Unterschiede feststellen, indem beide eine Markie-

rung von Asparaginsäure, Äpfelsäure und wenig Alanin neben einigen nichtidentifizierten Verbindungen zeigen. Obgleich bei der Mutante die Unterschiede zwischen Licht- und Dunkelexperiment gering sind, ist doch eine Lichtstimulierung festzustellen, die sich auch in der Verteilung der Radioaktivität auf verschiedene Produkte ausdrückt: Im Licht werden im Gegensatz zum Dunkelexperiment in geringer Menge auch Zuckerphosphate und PGS markiert, während eine Anhäufung von Alanin auffällig ist. Dies ist aus Abb. 2 zu ersehen, während Abb. 3 die Verhältnisse bei der Normalform wiedergibt, die

Abb. 2. Photosyntheseprodukte der Mutante. Bedingungen: 4 min Photosynthese von Blättern der Mutante in Gegenwart von $^{14}\text{CO}_2$, anschließend Alkoholextraktion, zweidimensionale Chromatographie und Autoradiographie.

Abb. 3. Photosynthese-Produkte der Normalform. Bedingungen: 4 min Photosynthese von Blättern der Normalform, sonst wie in Legende zu Abb. 3.

^{8a} M. CALVIN, C. HEIDELBERGER, J. C. REID, B. M. TOLBERT u. P. E. YANKWICH, Isotopic Carbon, New York 1949.

natürlich ein wesentlich intensiveres Verteilungsmuster aufweist.

Die Anhäufung von Alanin in der Mutante im Licht könnte als Zeichen dafür gewertet werden, daß die Reduktion von PGS zu Triosephosphat blockiert ist. An der Reduktion von PGS in den Chloroplasten sind ATP, TPNH und zwei Enzyme beteiligt. Die Bildung von Zuckerphosphat, wenn auch in geringer Menge, durch die Mutante spricht dafür, daß die Enzyme zur PGS-Reduktion vorhanden sind. Folgendes Experiment beweist die Richtigkeit dieser Annahme: Isolierte Chloroplasten der Mutante wurden in Gegenwart von Cofaktoren, ADP, P und TPN im Licht und im Dunklen mit $^{14}\text{CO}_2$ inkubiert. Das Ergebnis ist aus Tab. 3 ersichtlich: Der Einbau von

	$^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung in Imp./Min./mg Chloro- phyll · Stde.	
	im Licht	im Dunklen
ohne Zusatz von ATP und TPNH	$1,34 \cdot 10^6$	$1,27 \cdot 10^6$
mit $1 \mu\text{Mol}$ TPNH und $2 \mu\text{Mol}$ ATP	—	$19,90 \cdot 10^6$

Tab. 3. $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung isolierter Chloroplasten der Mutante. Bedingungen: Reaktionsgemisch (Zahlen in Klammern μMole): ADP (1), P (5), TPN (0,3), Thiaminpyrophosphat (1,4), Ascorbat (2,5), Glutathion (1,2), Flavinmononucleotid (0,0005), TRIS (20), $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (2), Chloroplasten mit $150 \mu\text{g}$ Chlorophyll, Gesamtvolumen 1 ml, pH 7,2, Belichtung in Warburg-Gefäßen im Warburg-Apparat VL, Dauer des Experimentes 30 min, Abtöten mit Methanol; Bestimmung der Fixierung im Aliquot nach CALVIN^{8a}.

markiertem Kohlenstoff in organische Substanz ist im Licht- und im Dunkelversuch gleich niedrig. Setzt man jedoch ATP und TPNH zu, so tritt lebhaftes $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung ein. Unter den markierten Produkten befinden sich Zuckerphosphate. Damit ist gezeigt, daß der Enzymapparat zur CO_2 -Fixierung intakt ist. Es muß also die in den Chloroplasten ablaufende lichtabhängige Bildung von ATP oder TPNH⁹ bei der Mutante ausgefallen sein. Der Defekt ist demnach wahrscheinlich in den unlöslichen Lamellenstrukturen der Chloroplasten zu suchen, die die am Elektronentransport beteiligten Enzyme enthalten, nicht in den löslichen Stromafaktoren, die die Fixierung von CO_2 und die Umwandlung in Kohlenhydrate bewirken¹⁰.

⁹ D. I. ARNON, F. R. WHATLEY u. M. B. ALLEN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **32**, 47 [1959].

¹⁰ A. V. TREBST, H. Y. TSUJIMOTO u. D. I. ARNON, Nature [London] **182**, 351 [1958].

3. Die Photosynthese-Phosphorylierung

Die Bestimmung der Photosynthese-Phosphorylierung in Chloroplasten von *Vicia faba* wird durch einen Hemmstoff kompliziert¹¹. Es können somit nur kleine Umsätze beobachtet werden. Trotzdem wurde Photophosphorylierung sowohl bei mutierten als auch bei normalen Pflanzen festgestellt. Tab. 4

Phosphorylierung in $\mu\text{Mol/mg}$ Chlorophyll · Stde.	Mutante	Kontrolle
Versuch 1	2,44	5,9
Versuch 2	23,7	14,7
AT ³² P-Bildung in $\mu\text{Mol/mg}$ Chlorophyll · Stde.	Mutante	Kontrolle
Versuch 3	1,9	1,0
Versuch 4	2,6	4,2
Versuch 5	5,7	—
Versuch 6	6,1	—

Tab. 4. Zyklische Photophosphorylierung isolierter Chloroplasten normaler und mutierter Pflanzen. Bedingungen^{11a}: Reaktionsgemisch (Zahlen in Klammern μMole): TRIS (15), NaCl (30), P bzw. ^{32}P (2), ADP (2), MgCl_2 (3,5), Phenacinnethosulfat (0,03), Chloroplasten mit $50\text{--}100 \mu\text{g}$ Chlorophyll, Volumen 1 ml, pH 7,5; Belichtung im Warburg-Apparat VL, Dauer des Experimentes 15 min; Phosphatbestimmung nach FISKE und SUBBAROW^{11b}; AT³²P-Bestimmung radiometrisch nach chromatographischer Trennung der Reaktionsprodukte.

gibt einige Daten wieder. Nur in einem Falle überschritt die Phosphatbindung $10 \mu\text{Mole/mg}$ Chlorophyll · Stunde, wobei die Mutante sogar eine höhere Reaktionsrate zeigte als die Kontrolle. Parallel vorgenommene Bestimmungen mit Spinat-Chloroplasten ergaben regelmäßig Phosphorylierungsraten zwischen 40 und $200 \mu\text{Mole/mg}$ Chlorophyll · Stunde.

Trotz der nur kleinen Raten läßt sich aus den Ergebnissen mit Sicherheit ableiten, daß die Mutante die Fähigkeit zur zyklischen Photophosphorylierung nicht verloren hat. Daß bei der Photophosphorylierung tatsächlich ATP in der Mutante gebildet wird, zeigen Versuche mit ^{32}P . Abb. 4 gibt ein Chromatogramm von Phosphorylierungsprodukten der Mutante wieder.

¹¹ U. HEBER, Z. Naturforschg. **15b**, 653 [1960].

^{11a} A. T. JAGENDORF u. M. AVRON, J. biol. Chemistry **231**, 277 [1957].

^{11b} C. H. FISKE u. Y. SUBBAROW, J. biol. Chemistry **81**, 629 [1929].

Abb. 4. Zyklische Photophosphorylierung durch isolierte Chloroplasten der Mutante. Bedingungen: Ansatz mit ^{32}P wie in Legende zu Tab. 4 angegeben. Nach 15 min Reaktionszeit im Licht Abtötung mit Methanol, Chromatographie und Autoradiographie.

4. Die Photoreduktion von TPN

Da die zyklische Photophosphorylierung der Mutante offenbar nicht beeinträchtigt ist, bleibt zu prüfen, ob eine Blockade der Photoreduktion von TPN stattgefunden hat. Die TPNH-Bildung wurde an Hand der Absorptionserhöhung bei $340\text{ m}\mu$ gemessen. Wie aus den Werten der Tab. 5 ersichtlich ist,

Versuch Nr.	Zusätze	Normalform	Mutante
1	keine	7,5	0
2	keine	10,4	0
3	0,2 ml Chloroplastenextrakt <i>Vicia</i>	9,45	—
4	0,2 ml Chloroplastenextrakt <i>Vicia</i>	5,95	—
5	keine	28,6	0
5	0,2 ml Chloroplastenextrakt Spinat	71,0	0
6	keine	32	0
6	0,2 ml Chloroplastenextrakt Spinat	64	0

Tab. 5. TPN-Reduktion im Licht durch isolierte Chloroplasten in $\mu\text{Molen/mg}$ Chlorophyll-Stde. Bedingungen: Reaktionsgemisch (Zahlen in Klammern μMole) ADP (4), P (4), TPN (1,5), TRIS (30), NaCl (60), MgCl_2 (7), Chloroplasten mit ca. $100\text{ }\mu\text{g}$ Chlorophyll; wo angezeigt, Zusatz von 0,2 ml Chloroplastenextrakt nach WHATLEY und Mitarbb.^{11c}. Gesamtvolumen 2 ml, pH 7,5; ein Anteil wird belichtet, der andere im Dunkeln gehalten; Differenzmessung bei $340\text{ m}\mu$. Berechnung auf Grund eines Absorptionskoeffizienten von $6,22 \cdot 10^6\text{ cm/Mol}$.

können isolierte Chloroplasten der Mutante im Gegensatz zur Normalform im Licht kein TPN reduzieren. Wir haben niemals eine Absorptionserhöhung bei $340\text{ m}\mu$ als Folge der Belichtung von Mutanten-Chloroplasten feststellen können. Tatsächlich wird in der Mutante sogar gelegentlich eine geringe Absorptionserniedrigung bei $340\text{ m}\mu$ durch Belichtung beobachtet; die Ursache dieses Verhaltens konnte noch nicht geklärt werden. Es genügt jedoch ein Zusatz von TPNH im Licht ohne gleichzeitige Gabe von ATP zu isolierten Chloroplasten der Mutante, um die lichtabhängige Fixierung von $^{14}\text{CO}_2$ (Licht minus Dunkelfixierung) von etwa 0 auf $5 \cdot 10^6\text{ Imp./min/mg}$ Chlorophyll-Stde. zu bringen. Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, daß die Mutante die Fähigkeit zur Photoreduktion von TPN zu TPNH entweder völlig verloren hat oder daß deren Rate so stark herabgesetzt ist, daß sie mit unseren Methoden nicht mehr nachgewiesen werden kann.

Die Wirkung des mutierten Gens beruht nicht auf dem Ausfall der Pyridinnucleotid-Reduktase oder eines anderen löslichen Faktors. Die Pyridinnucleotid-Reduktase überträgt Elektronen (oder Wasserstoff) einer im Lichte reduzierten Substanz auf TPN. Falls sie in der Mutante ausgefallen wäre, müßte der Zusatz des Enzyms zu isolierten Chloroplasten die Reduktion von TPN bewirken. Durch Zugabe eines Extraktes aus Spinat-Chloroplasten, der das Enzym neben anderen löslichen Faktoren enthält, wird die Reduktionsrate von TPN durch normale *Vicia*-Chloroplasten zwar beträchtlich erhöht; bei der Mutante wird jedoch auch nach Zugabe von Spinat-Chloroplastenextrakt keine Reduktion von TPN beobachtet (Tab. 5, Exp. 5 und 6). Der gen-bedingte Defekt ist folglich nicht durch einen wasserlöslichen Faktor verursacht, sondern muß in der unlöslichen Gerüststruktur der Chloroplasten — also in den Lamellensystemen^{12, 13} — zu suchen sein.

Um nähere Auskunft darüber zu erhalten, wo der Block die Elektronen-Transportkette der Chloroplasten unterbricht, untersuchten wir die Reduktion von TPN durch mutierte und normale Chloroplasten in Gegenwart von Ascorbat und reduziertem 2,6-Dichlorphenolindophenol¹⁴. VERNON, KAMEN und ZAUGG haben gezeigt, daß es möglich ist, eine der beiden Lichtreaktionen der Photosynthese zu sepa-

^{11c} F. R. WHATLEY, M. B. ALLEN, L. L. ROSENBERG, J. D. CAPINDALE u. D. I. ARNON, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **20**, 462 [1956].

¹² R. PARK u. N. G. PON, *J. molecular Biol.* **3**, 21 [1961].

¹³ G. JACOBI u. E. PERNER, *Flora* [Jena] **150**, 209 [1961].

¹⁴ L. P. VERNON u. M. D. KAMEN, *Arch. Biochem. Biophysics* **51**, 122 [1954].

rieren, indem Ascorbat als Elektronendonator benutzt wird^{14,15}. Unter normalen Bedingungen werden Elektronen des Wassers über eine vorgeschaltete Lichtreaktion in die Elektronen-Transportkette eingeleitet und reduzieren dann TPN¹⁶. Jedoch auch in Gegenwart von Ascorbat und katalytischen Mengen 2,6-Dichlorphenolindophenol, die zwischen den beiden Lichtreaktionen der Photosynthese am Cytochrom angreifen, wird in unseren Experimenten TPN nur von normalen, nicht aber von mutierten Chloroplasten reduziert. Der Block muß also am Ende der Elektronentransportkette liegen. Die folgenden Experimente sind mit dem Ziel durchgeführt worden, den Defekt weiter zu lokalisieren.

5. Die Hill-Reaktion

In der Hill-Reaktion werden photochemisch angeregte Elektronen eines Pigmentes auf einen Akzeptor übertragen, während die Auffüllung der Elektronenlücken durch einen Donator, meist Wasser, vorgenommen wird¹⁷. Als Elektronenakzeptor können u. a. 2,6-Dichlorphenolindophenol und Ferricyanid

Versuch Nr.	Normalform	Mutante
A. 2,6-Dichlorphenolindophenol als Hill-Reagens		
1	94	21,5
2	98	42
3	55,5	20
4	160	52
5	69	27,5
6	—	33,5
7	256	41
B. Kalium-Ferricyanid als Hill-Reagens		
7	258	33
8	115	36
9	71	31

Tab. 6. Photoreduktion von 2,6-Dichlorphenolindophenol und Ferricyanid durch isolierte Chloroplasten normaler und mutierter Pflanzen in $\mu\text{Molen/mg}$ Chlorophyll $\cdot$ Stunde. Bedingungen: A. Reaktionsgemisch (μMole): TRIS (50), 2,6-Dichlorphenolindophenol (0,2), KCl (3), Methanol 0,2 ml, Chloroplasten mit 20–60 μg Chlorophyll, Volumen 2 ml, $p\text{H}$ 7,5, Messung bei 620 $m\mu$. Reduktionswerte sind nicht korrigiert für eine lichtunabhängig verlaufende Reoxydation des lichtreduzierten Farbstoffes; tatsächliche Reduktionsraten also höher als angegeben. B. Reaktionsgemisch (μMole): ADP (2), P (10), TRIS (30), NaCl (60), MgSO_4 (7), $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ (2,5), Chloroplasten mit ca. 50 μg Chlorophyll, Volumen 2 ml, $p\text{H}$ 7,5; Messung bei 400 $m\mu$.

nid dienen. Diese beiden Stoffe greifen an verschiedenen Stellen der Elektronen-Transportkette an^{16,18}. Wir prüften nun isolierte Chloroplasten der Mutante sowie von Normalpflanzen auf ihre Fähigkeit, die Hill-Reaktion durchzuführen. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 dargestellt. Sowohl 2,6-Dichlorphenolindophenol als auch Ferricyanid werden von den Chloroplasten im Lichte reduziert. Die Reduktionsraten der Mutante sind niedriger als die normaler Pflanzen. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß es sich hierbei um eine sekundäre Folge des Defektes handelt: Bei der Mutante lassen sich im Vergleich zur Normalform große Mengen von Asparagin und bestimmten Aminosäuren nachweisen. Hieraus kann geschlossen werden, daß in der Mutante, die sich infolge fehlender Photosynthese im Hungerzustande befindet, Proteinabbau vonstatten geht. Von diesem Abbau werden vermutlich auch die Enzyme der Elektronen-Transportkette betroffen, so daß niedrigere Umsatzraten als bei der Normalform zu erwarten sind.

6. Die photochemische Sauerstoff-Entwicklung

Die Reduktion von Hill-Reagentien besagt nicht eindeutig, daß der Enzymapparat zur Entwicklung von O_2 aus Wasser in der Mutante unbeeinflusst geblieben ist. Wir prüften deshalb manometrisch die Sauerstoffentwicklung bei der Photoreduktion von Ferricyanid. Die Ergebnisse zeigen klar, daß auch die Mutante die Fähigkeit zur Sauerstoffentwicklung besitzt (Tab. 7). Für die Anregung zu diesem Experiment danken wir Herrn Professor Dr. D. J. ARNON, Berkeley.

	Normalform	Mutante
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ -Reduktion [μMole]	56	30
O_2 -Produktion [$\mu\text{Äquivalente}$]	58	23

Tab. 7. Sauerstoff-Entwicklung und Hill-Aktivität isolierter Chloroplasten. Bedingung: spektrophotometrische Bestimmung der Ferricyanid-Reduktion wie in Tab. 6 B und manometrische Messung des Gasausstosses.

Diskussion

Die Photosynthese von Chloroplasten kann auf Grund der Ergebnisse von TREBST, TSUJIMOTO und

¹⁵ L. P. VERNON u. W. S. ZAUGG, Biochem. J. **235**, 2728 [1960].

¹⁶ B. RUMBERG, A. MÜLLER u. H. T. WITT, Nature [London] **194**, 854 [1962].

¹⁷ D. I. ARNON, Nature [London] **184**, 10 [1959].

¹⁸ M. LOSADA, F. R. WHATLEY u. D. I. ARNON, Nature [London] **190**, 606 [1961].

ARNON¹⁰ experimentell in lichtabhängige Reaktionen, die zur Bildung von ATP und TPNH führen, und Dunkelreaktionen zerlegt werden, in denen mit Hilfe von ATP und TPNH CO₂ fixiert und zur Kohlenhydratstufe reduziert wird. In Abb. 5 ist der Ge-

Abb. 5. Die Trennung der Assimilation von CO_2 zur Stufe von Zuckern in verschiedene Phasen im Schema.

samtverlauf der Photosynthese schematisch zusammengefaßt. Der Ablauf der Dunkelreaktionen ist heute gut bekannt¹⁹. Auf eine nähere Betrachtung kann verzichtet werden, da die an der Mutante erhaltenen Ergebnisse eindeutig darauf hinweisen, daß die löslichen Enzyme der Dunkelreaktionen durch den Mutationsschritt nicht betroffen sind.

Die Vorstellungen über die Vorgänge in der Lichtphase konnten in letzter Zeit erweitert werden. Es erscheint gesichert, daß zwei Photoreaktionen beteiligt sind^{18, 20-25}. Vor allem auf Grund der Analyse kurzzeitiger Absorptionsänderungen in verschiedenen Bereichen des Spektrums gelang es WITT, isolierte Befunde in ein geschlossenes Schema des Elektronentransportes einzuordnen¹⁶, das im wesentlichen den A r n o n s c h e n Vorstellungen^{17, 18} folgt. Zur Deutung unserer Befunde stützen wir uns auf das von WITT angegebene Schema¹⁶, das vereinfacht in Abb. 6 dargestellt ist.

Aus der Abbildung wird ersichtlich, daß Wasser in den Chloroplasten der höheren Pflanze als natürlicher Elektronendonator dient, TPN als Elektronenakzeptor. Die Potentialdifferenz von etwa 1,1 V wird mittels zweier Photoreaktionen an Chlorophyll bzw. noch einem anderen Pigment überwunden. Im ersten Schritt der Gesamtreaktion wird ein Akzeptor X vom Pigment Y photochemisch redu-

Abb. 6. Schema des Elektronentransportes in der Photosynthese nach Wirtz¹⁶, vereinfacht. Gerade Pfeile: Richtung des Elektronentransportes. DPIP 2,6-Dichlorphenolindophenol, Chl a Chlorophyll a.

ziert, während das Pigment über die Oxydation von Wasser zu Sauerstoff und Protonen in den Grundzustand zurückkehrt. Der reduzierte Akzeptor $X^{\ominus}$ kann unter den Bedingungen des in vitro-Experimentes von 2.6-Dichlorphenolindophenol direkt oxidiert werden (Hill-Reaktion). Wie gezeigt wurde, wird diese Reaktion von der Mutante durchgeführt.

In einer zweiten Lichtreaktion reduzieren Elektronen von Chlorophyll a einen Akzeptor Z, worauf das oxydierte Chlorophyll über Cytochrom und E (Plastochinon) $X^{\ominus}$ oxydiert. Der reduzierte Akzeptor $Z^{\ominus}$ vermag mit Hilfe eines löslichen Chloroplastenextraktes, der die photosynthetische Pyridinnucleotid-Reduktase enthält, TPN zu reduzieren. Jedoch kann er auch, wahrscheinlich über Plastochinon, von Ferricyanid oxydiert werden (Hill-Reaktion). Auch diese Reaktion kann die Mutante durchführen, während sie nicht zur Reduktion von TPN befähigt ist.

Beim Elektronentransport zwischen $X^{\oplus}$ und Cytochrom wird ATP gebildet. Jedoch kann der Elektronentransport auch kurzgeschlossen werden, indem angeregte Elektronen von Chlorophyll a über Z, A und B (möglicherweise Plastochinon und Cytochrom?) zu Chlorophyll a zurückfließen, wobei Phosphorylierung von ADP zu ATP stattfindet. In vitro wird diese zyklische Photophosphorylierung durch Phenacinnmethosulfat katalysiert. In Gegenwart von Phenacinnmethosulfat vermag die Mutante in einer lichtabhängigen Reaktion ATP zu bilden. Das zeigt, daß das dazu benötigte System durch die Mutation nicht beeinflußt wurde.

¹⁹ J. A. BASSHAM u. M. CALVIN, *The Path of Carbon in Photosynthesis*, New Jersey 1957.

²⁰ R. EMERSON u. E. RABINOVITCH, *Plant Physiol.* **35**, 477 [1960].

²¹ J. MYERS u. C. S. FRENCH, J. gen. Physiol. **43**, 723 [1960].

²² H. T. WITT, R. MORAW, A. MÜLLER, B. RUMBURG u. G. ZIEGLER, Z. Elektrochem., Ber. Bunsenges. physik. Chem. **64**, 181 [1960].

²³ R. HILL u. F. BENDALL, Nature [London] **186**, 136 [1960].

²⁴ M. B. ALLEN, L. H. PIETTE u. J. C. MURCHIO, Biochem. biophysic. Res. Commun. **4**, 271 [1961].

²⁵ L. N. M. DUYSSENS, J. AMESZ u. B. M. KAMP, *Nature* [London] **190**, 510 [1961].

Aus der Fähigkeit der Mutante zur Sauerstoffentwicklung unter gleichzeitiger Reduktion von Hill-Reagentien geht hervor, daß auch das Sauerstoff entwickelnde System intakt ist. Weiterhin läßt sich aus der Reduktion von Ferricyanid durch die Mutante ableiten, daß der größte Teil der Elektronen-Transportkette funktionsfähig ist. Dieser Schluß beruht auf der Annahme, daß Ferricyanid lediglich am Ende der Elektronen-Transportkette reduziert werden kann. Aus spektroskopischen Messungen ergibt sich, daß sie gerechtfertigt ist (MÜLLER, RUMBERG, private Mitteilung). Jedoch läßt sich auch auf anderem Wege zeigen, daß der Block der Mutante am Ende der Elektronen-Transportkette lokalisiert sein muß. Es wurde schon dargelegt, daß Mutantenchloroplasten TPN nicht reduzieren können. Wenn nun der Block nicht am Ende der Elektronen-Transportkette, sondern vor dem Cytochrom liegt, sollte es möglich sein, die TPN-Reduktion durch eine Reduktion von Cytochrom mittels Ascorbat über 2.6-Dichlorphenolindophenol zu erzwingen¹⁵. Es erwies sich, daß das nicht möglich ist (vgl. S. 41/42).

Da die Mutante neben der Ferricyanid-Reduktion auch zur zyklischen Photophosphorylierung in der Lage ist, die beide den Faktor Z (vgl. Abb. 6) benötigen, muß geschlossen werden, daß der Block zwischen dem Faktor Z und der Reduktion von TPN lokalisiert ist. Ein löslicher Faktor kann für den

Block nicht verantwortlich sein, da die Zugabe von löslichem Chloroplasten-Extrakt aus Spinat die TPN-Reduktion nicht in Gang setzt.

Wir können also aus unseren Ergebnissen die Existenz eines unlöslichen Faktors ableiten, der im Lamellarsystem der Chloroplasten lokalisiert ist und, mittel- oder unmittelbar, von Z Elektronen (oder Wasserstoff) aufnimmt und auf TPN überträgt.

Es bleibt noch kurz zu diskutieren, warum auch die Mutante eine geringe Lichtfixierung von $^{14}\text{CO}_2$ zeigt und warum neben PGS auch Zuckerphosphate in sehr geringer Menge markiert auftreten. Die wahrscheinlichste Erklärung besteht darin, daß auf dem Wege über die zyklische Photophosphorylierung im Licht aus endogenem Zucker Ribulosediphosphat gebildet wird, das in die Carboxydismutase-Reaktion eingeht. Dabei gebildete PGS mag nach Phosphorylierung durch DPNH reduziert werden, das aus der Dehydrierung von Atmungsmaterial stammt. Darauf folgende Reaktionen des Calvin-Zyklus würden dann zu markiertem Zuckerphosphat führen.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Bundesministerium für Atomkernenergie für eine Sachbeihilfe sowie Herrn Prof. Dr. H. ULLRICH für anregende Diskussionen.