6. Schluß

Auf Grund von völlig andersartigen Untersuchungen, nämlich der Induktionsphänomene der Chlorophyllfluoreszenz, schließen MALKIN und KOK¹⁰, daß sich zwischen den Lichtreaktionen II und I in der Elektronentransportkette zwei unbekannte Stoffe Q und P, mit einem mittleren Molekülnzahlverhältnis $Q/Chl-a_I \approx 6/1$ und $P/Chl-a_I \approx 6/1$ befinden.

JOLIOT¹¹ kommt auf Grund von Untersuchungen der O₂-Produktion an Chlorella-Algen ebenfalls zu dem Schluß, daß zwischen den Lichtreaktionen II und I in der Elektronentransportkette zwei unbekannte Stoffe A₁ und A₂ existieren. Ihre Molekül-

zahlverhältnisse werden angegeben mit:

$$A_1/Chl-a_I \approx 5/1 \quad \text{und} \quad A_2/Chl-a_I \approx 15/1.$$

Die nicht identifizierten Stoffe Q (KOK) bzw. A₁ (JOLIOT) sind möglicherweise mit Plastochinon identisch.

P (KOK) bzw. A₂ (JOLIOT) entsprechen vielleicht dem Gegenspeicher Chl-a_I, Cyt-f und U.

Aus Messungen der O₂-Produktion an isolierten Chloroplasten (ohne Elektronenakzeptor) kommen sowohl DE KOUCHKOVSKY et al.¹² als auch FORK¹³ zu dem Schluß, daß in der Elektronentransportkette ein Speicher existieren muß.

¹⁰ S. MALKIN u. B. KOK, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **126**, 413 [1966]; S. MALKIN, **126**, 433 [1966].

¹¹ P. JOLIOT, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **102**, 116 [1965].

¹² Y. DE KOUCHKOVSKY u. I. M. BRIANTAIS, in: „Photosynthetic Mechanisms of Green Plants“, Publ. 1145, 362, Natl. Acad. Sci.-Natl. Res. Council, Washington, D.C. (1963).

¹³ D. C. FORK, Plant Physiol. **38**, 323 [1963].

Cytochrom-b-563 als natürlicher Elektronenüberträger in einem zyklischen Elektronentransport der Photosynthese

J. WEIKARD

Max-Volmer-Institut, I. Institut für Physikalische Chemie, Technische Universität Berlin

(Z. Naturforsch. **23 b**, 235—238 [1968]; eingegangen am 24. Juli 1967)

By excitation of spinach chloroplasts with flashes ($5 \cdot 10^{-5}$ sec) of far red light $h\nu_I$ ($\lambda=728$ nm) and with addition of $2 \cdot 10^{-4}$ M/l benzylviologen as electron acceptor irreversible absorption changes are observed as depicted in fig. 1 top. With 10^{-3} M/l $K_3Fe(CN)_6$ as electron acceptor irreversible changes are observed as depicted in fig. 1 bottom. The difference of the spectra in fig. 1 is presented in fig. 2. Fig. 2 corresponds to the spectrum which is caused by reduction of a cytochrome-b-563. Thus excluding $K_3Fe(CN)_6$ as electron acceptor cytochrome-b-563 can be reduced by $h\nu_I$ ($\lambda=728$ nm). A re-oxidation occurs by red light $h\nu_{II}$ ($\lambda=663$ nm), s. figs. 3, 4. These results demonstrate a natural cyclic flow of electrons including both light reactions Chl-a_I and Chl-a_{II} (s. fig. 6).

The results are reviewed in l. c.¹⁰.

Cytochrom-b wurde 1952 als eine der chemischen Komponenten der Chloroplasten entdeckt¹. Durch Messungen kurzzeitiger Absorptionsänderungen konnte die Beteiligung von Cytochrom-b am Elektronentransport der Photosynthese nachgewiesen werden^{2, 3}. Dabei wurde gezeigt, daß Cytochrom-b

in einer Redoxreaktion zwischen den beiden Lichtreaktionen der Photosynthese fungiert.

Im folgenden wird über Messungen von Absorptionsänderungen an Chloroplasten berichtet, die eine neue Cytochrom-b-Reaktion beschreiben. Aus diesen Messungen folgt, daß ein Cytochrom-b-563 an einem

¹ H. E. DAVENPORT, Nature [London] **170**, 1112 [1952].

² B. RUMBERG, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **102**, 354 [1965].

³ G. HIND and J. M. OLSON, in: „Energy Conversion by the Photosynthetic Apparatus“, Brookhaven National Laboratory, Upton, N. Y. 1966, p. 188.

Elektronentransport beteiligt ist, der dem bisher entdeckten ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Chl-a}_{\text{II}} \rightarrow \text{Chl-a}_{\text{I}} \rightarrow \text{NADP}^*$) entgegengerichtet ist ($\text{Chl-a}_{\text{I}} \rightarrow \text{Cyt-b-563} \rightarrow \text{Chl-a}_{\text{II}}$). Auf diese Weise kommt ein natürlicher zyklischer Elektronentransport zustande, der *beide* Lichtreaktionen einschließt.

Experimentelles

Absorptionsänderungen wurden mit einem Spektralphotometer ähnlich dem in l. c.⁴ beschriebenen gemessen. Das Meßlicht wurde durch einen Bausch u. Lomb-Monochromator (Halbwertsbreite 5 nm) monochromatisiert. (Intensität bei 563 nm: $100 \text{ erg cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$). Zur Anregung wurden folgende Filter von Schott benutzt: AL 728 (für $h\nu_{\text{I}}$), RG 1 (für $h\nu_{\text{I}} + h\nu_{\text{II}}$) und AL 663 (für Zusatzdauerlicht $h\nu_{\text{II}}$). Als Wärmeschutzfilter dienten Kombinationen von KG 3 (Schott) und Calfex C (Balzers). Die Messungen wurden an einer Suspension von ganzen „stripped“ Chloroplasten von Spinat durchgeführt.

Ergebnisse

Bei Anregung einer Suspension von Spinatchloroplasten mit $h\nu_{\text{I}}$ ($\lambda = 728 \text{ nm}$, $5 \cdot 10^{-5} \text{ sec}$), welches nur Chl-a_{I} erregt, beobachtet man bei Zusatz von *Kaliumferricyanid* als Elektronenakzeptor reversible und irreversible Absorptionsänderungen. Die *irreversiblen* Absorptionsänderungen in Abhängigkeit von der Wellenlänge sind in Abb. 1 (unten) dargestellt. Ähnliche Absorptionsänderungen sind ausführlich schon an anderer Stelle beschrieben und analysiert worden⁵.

Verwendet man als Elektronenakzeptor *Benzylviologen*, so beobachtet man die in Abb. 1 (oben) dargestellten *irreversiblen* Absorptionsänderungen.

Bildet man die Differenz der beiden in Abb. 1 gezeigten Spektren, so erhält man ein neues Spektrum, das dem entspricht, das bei der Reduktion eines Cytochrom-b auftritt. Diese Differenz ist in Abb. 2 aufgezeichnet. Die Maxima des in dieser Abbildung dargestellten Spektrums liegen bei 563, 533 und 431 nm. Sie stimmen mit den bei der Reduktion von Cytochrom- b_6 in vitro gemessenen^{1,6} gut überein. Aus diesen Ergebnissen folgt, daß bei An-

Abb. 1. Irreversible Absorptionsänderungen an Chloroplasten von Spinat bei Anregung mit kurzen Blitzen $h\nu_{\text{I}}$ ($\lambda = 728 \text{ nm}$) in Abhängigkeit von der Wellenlänge bei Zusatz von Benzylviologen (oben) und Kaliumferricyanid (unten). Chlorophyllgehalt: $0,2 \text{ mg/ml}$; O_2 -Produktion: $89/35 \text{ } \mu\text{M O}_2/\text{mg Chlorophyll} \cdot \text{h}$ (mit/ohne NH_4Cl); Puffer: Tris-HCl, pH 7,2, $0,05 \text{ M/l}$; Elektronenakzeptor: $2 \cdot 10^{-4} \text{ M/l Benzylviologen}$ (oben) und $10^{-3} \text{ M/l K}_3\text{Fe(CN)}_6$ (unten); Phosphorylierungsentkoppler: $4 \cdot 10^{-3} \text{ M/l NH}_4\text{Cl}$; Schichtdicke der Küvette: $1,2 \text{ mm}$; Anregung: Filter AL 728 und Kg 3/2 mm, Dauer: $5 \cdot 10^{-5} \text{ sec}$, Sättigungsintensität; Halbwertsbreite des Meßlichts: 5 nm , Intensität bei 563 nm : $100 \text{ erg cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$; Temperatur: 25°C ; elektrische Bandbreite: 70 Hz .

Abb. 2. Differenz der in Abb. 1 gezeigten Spektren.

regung mit $h\nu_{\text{I}}$ und bei Verwendung von Benzylviologen als Elektronenakzeptor eine irreversible Cytochrom-b-563-Reduktion stattfindet (Abb. 1, oben), bei Verwendung von Kaliumferricyanid jedoch nicht (Abb. 1, unten).

Die folgenden kinetischen Messungen wurden bei 563 nm ausgeführt. Die Absorptionsänderung bei

* Abkürzungen: Cyt = Cytochrom, Chl-a_{I} , Chl-a_{II} = spezielle Chlorophyll-a-Moleküle, NADP = Nikotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, PMS = N-Methylphenazonium-methosulfat, DCMU = 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff.

⁴ H. T. WITT, R. MORAW u. A. MÜLLER, Z. physik. Chem. N. F. 20, 193 [1959].

⁵ H. T. WITT, B. RUMBERG, P. SCHMIDT-MENDE, U. SIGGEL, B. SKERRA, J. VATER u. J. WEIKARD, Angew. Chem. 77, 821 [1965]; Angew. Chem. 4, 799 [1965], Intern. Ed. in Englisch.

⁶ R. HILL and W. D. BONNER, in: "Light and Life", John Hopkins Press, Baltimore 1961, p. 424.

563 nm nach Blitzlichtanregung mit $h\nu_I$ ($\lambda = 728$ nm) ist praktisch irreversibel, abgesehen von einer langsamen (>1 sec) Reoxydation, die wahrscheinlich durch Luftsauerstoff verursacht wird (s. Abb. 3, 4 und 5). Strahlt man nach Belichtung mit $h\nu_I$ anschließend $h\nu_{II}$ -Licht ein, ($\lambda > 600$ nm, die $h\nu_I$ -Komponente des Anregungslichtes ist unter diesen Bedingungen unwirksam), so beobachtet man ein Abklingen der Absorptionsänderungen entsprechend einer Reoxydation des Cytochrom-b-563 (s. Abb. 3).

Abb. 3. Zeitlicher Verlauf der Absorptionsänderungen bei 563 nm an Chloroplasten von Spinat bei aufeinander folgender Anregung mit Blitzen $\lambda = 728$ nm und $\lambda > 600$ nm. Meßbedingungen wie Abb. 1 bis auf: Elektronenakzeptor: $2 \cdot 10^{-4}$ M/l Benzylviologen; Filter für zweiten Blitz: RG 1/2 mm, KG 3/2 mm, Calfex C und 5 cm H_2O , Dauer: $8 \cdot 10^{-3}$ sec, Intensität: $5 \cdot 10^5$ erg $cm^{-2} sec^{-1}$; Intensität des Meßlichtes: 30 erg $cm^{-2} sec^{-1}$; elektrische Bandbreite 17 Hz.

Dem Abklingen ist ein vorübergehender kurzer Anstieg überlagert, der evtl. durch das in l. c. ^{2,3} beschriebene, zwischen den beiden Lichtreaktionen lokalisierte Cytochrom-b zustande kommt.

Die Cytochrom-b-563-Reaktion bei Anregung mit $h\nu_I$ verläuft reversibel, wenn man bei den Messungen zusätzlich $h\nu_{II}$ -Licht ($\lambda = 663$ nm) einstrahlt (s. Abb. 4). Die Halbwertszeit der Reoxydation ist von der Intensität des Zusatzdauerlichts $h\nu_{II}$ abhängig. Die kürzeste Halbwertszeit wurde mit Zusatzdauerlicht $h\nu_{II}$ ($\lambda = 663$ nm) der Intensität $4 \cdot 10^3$ erg $cm^{-2} sec^{-1}$ erreicht, nämlich $\tau_{1/2} = 10^{-2}$ Sekunden. Bei höherer Intensität des Zusatzdauerlichts $h\nu_{II}$ regt dessen unvermeidbarer $h\nu_I$ -Anteil die Cytochrom-b-563-Reduktion bereits an, so daß die Absorptionsänderungen bei 563 kleiner werden.

Das durch die Anregung mit $h\nu_I$ reduzierte Cytochrom-b-563 kann anstatt durch $h\nu_{II}$ -Licht auch durch chemische Zusätze reoxydiert werden. So beobachtet man bei Zusatz von PMS (oder PMS + Ascorbat im Überschuß) eine schnelle Reoxydation des reduzierten Cytochrom-b-563 (s. Abb. 5). Die

Abb. 4. Zeitlicher Verlauf der Absorptionsänderungen bei 563 nm an Chloroplasten von Spinat bei Anregung mit kurzen Blitzen $h\nu_I$ ohne (oben) und mit (unten) Zusatzdauerlicht $h\nu_{II}$ (Filter: AL 663 KG 3/2 mm, Calfex C und 5 cm H_2O , Intensität: $1,5 \cdot 10^3$ erg $cm^{-2} sec^{-1}$). Meßbedingungen wie Abb. 1 bis auf: O_2 -Produktion: 112/35 μM O_2 /mg Chlorophyll $\cdot h$ (mit/ohne NH_4Cl); Elektronenakzeptor: $2 \cdot 10^{-4}$ M/l Benzylviologen; Intensität des Meßlichts 200 erg $cm^{-2} sec^{-1}$; elektrische Bandbreite 230 Hz.

Abb. 5. Zeitlicher Verlauf der Absorptionsänderungen bei 563 nm an Chloroplasten von Spinat bei Anregung mit kurzen Blitzen $h\nu_I$ ohne (oben) und mit (unten) Zusatz von 10^{-5} M/l PMS und 10^{-3} M/l Natriumascorbat. Meßbedingungen wie Abb. 1 bis auf: Chlorophyllgehalt: 0,3 mg/ml O_2 -Produktion: 94/42 μM O_2 /ml Chlorophyll $\cdot h$ (mit/ohne NH_4Cl). Elektronenakzeptor: $2 \cdot 10^{-4}$ M/l Benzylviologen; elektrische Bandbreite: 230 Hz.

Halbwertszeit der Rückreaktion ist abhängig von der PMS-Konzentration und vom Ascorbat-Zusatz.

Bei Zusatz von 10^{-6} M/l DCMU tritt bei Anregung mit $h\nu_I$ zwar die irreversible Absorptionsänderung bei 563 nm auf, die der Reduktion des Cytochrom-b-563 zuzuordnen ist, jedoch läßt sich bei Zusatz von DCMU durch $h\nu_{II}$ -Licht keine Reoxydation erreichen.

Diskussion

Die Reduktion des Cytochrom-b-563 bei Anregung der Lichtreaktion I zeigt, daß das oxydierte

Cytochrom-b-563 Elektronenakzeptor der Lichtreaktion I ist. Aus der Reoxydierbarkeit des reduzierten Cytochrom-b-563 durch $h\nu_{II}$ -Licht kann geschlossen werden, daß ein Stoff, der durch Anregung der Lichtreaktion II oxydiert wird, als Elektronenakzeptor für das reduzierte Cytochrom-b-563 dient. Es liegt also ein Elektronentransport vor, der dem bisher bekannten ($H_2O \rightarrow Chl-a_{II} \rightarrow Chl-a_I \rightarrow NADP$) entgegengesetzt ist ($Chl-a_I \rightarrow Cyt-b-563 \rightarrow Chl-a_{II}$). Diese Beobachtungen sind nur durch die Existenz eines zyklischen Elektronentransports zu erklären (s. Abb. 6). Ein pseudozyklischer Elektronentransport (über den Luftsauerstoff) ist nach Abb. 3 und nach den Versuchen bei Zusatz von DCMU auszuschließen.

Abb. 6. Vereinfachtes Schema der Funktion des Cytochrom-b-563 im Elektronentransport der Photosynthese.

Aus Untersuchungen über die Photophosphorylierung wurde bisher indirekt auf das Vorhandensein eines *künstlichen* zyklischen Elektronentransportes geschlossen⁷; dieser wird jedoch nur durch Erregung von $Chl-a_I$ angetrieben. Außerdem ist zum Ablauf desselben ein künstlicher Elektronenüberträger notwendig. Im Unterschied dazu sind

für den Antrieb des hier nachgewiesenen zyklischen Elektronentransportes beide aktiven Pigmente $Chl-a_I$ und $Chl-a_{II}$ anzuregen. Außerdem handelt es sich hier um einen *natürlichen* zyklischen Elektronenfluß.

Dieser zyklische Elektronentransport kann künstlich durch PMS kurzgeschlossen werden und benötigt dann als Antrieb nur noch $Chl-a_I$ (s. Abb. 6).

Bei Zusatz von Kaliumferricyanid als Elektronenakzeptor wird eine Reduktion von Cytochrom-b-563 offenbar verhindert, weil das Kaliumferricyanid nach l. c.⁸ Elektronen zwischen den beiden Lichtreaktionen akzeptiert.

Durch DCMU wird die Cytochrom-b-563-Reoxydation völlig unterbunden. Da DCMU als Hemmstoff für die Reaktion von $Chl-a_{II}$ bekannt ist, ist dies ein weiterer Hinweis dafür, daß der hier beschriebene natürliche zyklische Elektronentransport $Chl-a_{II}$ mit einschließt.

Aus der Größe der Absorptionsänderung bei 563 nm läßt sich abschätzen, wieviel Elektronen am zyklischen Transport beteiligt sind. Es ergibt sich, daß ein Cytochrom-b-563 pro 2200 Chlorophyllmoleküle und Blitz reduziert wird.

Auf Grund der Ergebnisse sollte erwartet werden, daß ohne Zusatz eines künstlichen Elektronenüberträgers eine zyklische Photophosphorylierung an Chloroplasten ablaufen sollte. Erste Hinweise darüber liegen vor⁹.

Ein zyklischer Elektronentransport sollte vom Zusatz des Elektronenakzeptors Benzylviologen unabhängig sein. Tatsächlich treten auch ohne Zusatz von Benzylviologen die für Cytochrom-b-563 typischen Absorptionsänderungen auf.

Herrn Professor Dr. H. T. WITT danke ich für zahlreiche Anregungen und Diskussionen.

⁷ D. I. ARNON, in: "Currents in Photosynthesis", Ad. Donker, Rotterdam 1966, p. 465.

⁸ P. SCHMIDT-MENDE u. H. T. WITT, Z. Naturforschg. **23 b**, 228 [1968].

⁹ U. SIGGEL u. B. RUMBERG, unveröffentlicht.

¹⁰ H. T. WITT, Nobel Symposium V, 1967, p. 261, Almquist & Wiksell, Stockholm, Interscience Publ., New York, London, Sidney.