

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE LICHTINDUZIERTEN  
REVERSIBLEN XANTHOPHYLLUMWANDLUNGEN  
AN *CHLORELLA* UND *SPINACIA*

A. HAGER

Botanisches Institut der Universität, München 19

Eingegangen am 8. Dezember 1966

STUDIES ON THE LIGHT-INDUCED REVERSIBLE  
XANTHOPHYLL-CONVERSIONS IN *CHLORELLA*  
AND SPINACH LEAVES

*Summary.* 1. Using new methods in thin-layer chromatography, experiments were carried out to prove the light-induced changes in the quantity of various xanthophylls in *Chlorella* and spinach leaves. The probable connection of these interconversions to electron transport in photosynthesis was demonstrated.

2. The kinetics of these xanthophyll conversions were investigated during strong illumination and in the succeeding dark period (*Chlorella*).

Already after illumination of 1 min one can detect a decrease of the di-epoxide xanthophyll violaxanthin and a corresponding increase of the epoxide-free zeaxanthin. The intermediate of this interconversion is the mono-epoxide antheraxanthin. Neoxanthin exhibits no change in concentration under the given light intensity and an illumination time of 60 min and more; the same result can be observed with the other carotenoids ( $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene, lutein, lutein-5,6-epoxyd) and the chlorophylls a and b.

3. The light-induced formation of zeaxanthin is not correlated with those pigment interconversions which are photooxidative in their nature and which may be detected only after long illuminations. However, by using damaged, e.g., briefly heated *Chlorella* cells, a photooxidative-induced decrease of carotenes and chlorophyll a and a smaller decrease of xanthophylls and chlorophyll b could already be demonstrated after illumination of 15 min. In this case the ratio xanthophylls/carotenes increases.

4. The transformation violaxanthin  $\rightarrow$  antheraxanthin  $\rightarrow$  zeaxanthin ("forward-reaction") is induced not only by an illumination with white light (point 2) but also with red light ( $>600$  nm); that means the reaction proceeds at a wavelength which cannot be absorbed by the xanthophylls themselves. Chlorophyll acts as light-acceptor.

5. The "forward-reaction" does not proceed after the cells have been heated for a short time. The presence of inhibitors of light-reaction II in photosynthesis such as o-phenanthroline, hydroxylamine and DCMU entirely suppresses the above reaction. The inhibition by DCMU can be reversed by substances (in *Chlorella*) which initiate or increase the cyclic electron transport at chlorophyll  $a_1$ : vitamin  $K_5$  and hexylresorcinol.

*Abkürzungen.* AS = Ascorbinsäure; CCCP = m-Chlorcarbonylcyanidphenylhydrazon; DCMU = 3-(3',4'-dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff; DPIP = 2,6-Dichlorphenolindophenol; FMN = Flavinmononucleotid; NADP = Nicotinamid-adeninucleotidphosphat; PMS = Phenazinmethosulfat; SA = Salicylaldehyd.

In contrast to its effect in chloroplasts (unpublished results), salicylaldehyde is only a very weak inhibitor of xanthophyll-conversion. Cyanide does not influence the "forward-reaction"; furthermore the reaction can be observed under aerobic and anaerobic conditions. The light-induced formation of zeaxanthin is entirely suppressed by the uncouplers CCCP and methylamine in concentrations of  $10^{-4}$  M and  $5 \times 10^{-4}$  M, respectively.

6. The light-independent backward-reaction zeaxanthin  $\rightarrow$  antheraxanthin  $\rightarrow$  violaxanthin, which normally prevents a high accumulation of zeaxanthin, does not proceed under anaerobic conditions. Therefore under such conditions accumulation of zeaxanthin can be observed even in dim light.

7. The results indicate that the light-induced transformation violaxanthin  $\rightarrow$  antheraxanthin  $\rightarrow$  zeaxanthin, which consists in the light-induced splitting of the epoxide oxygen from violaxanthin, is not identical with the process which causes the release of oxygen in photosynthesis. There is evidence, however, that the xanthophyll-conversion is coupled with that electron-transport which goes on between reduced plastoquinone and oxidized chlorophyll  $a_1$ ; energy-rich compounds which are formed in this step of electron transport or ATP itself apparently is responsible for the cleavage of the oxygen from violaxanthin and for the resulting formation of zeaxanthin.

In neuerer Zeit sind bei den Carotinoiden höherer Pflanzen und Algen unter dem Einfluß von Licht reversible Mengenänderungen festgestellt worden, die auf eine chemische Umwandlung oder Strukturänderung, also auf einen Stoffwechsel schließen lassen. Damit wird die Frage nach der Funktion dieser Farbstoffe, denen man bisher nur physikalische Aufgaben in den Chromatophoren zuerkannte, erneut aufgeworfen.

Die Untersuchungen an Blättern verschiedener Pflanzen hatten bereits 1957 ergeben (HAGER, S. 539), daß bestimmte Xanthophylle, z. B. das Zeaxanthin und ein Xanthophyllepoxyd im Starklicht vermehrt werden und daß diese Erscheinung auch im Rotlicht zu beobachten ist; ferner hatten sie gezeigt, daß diese Mengenänderungen im Schwachlicht wieder rückläufig sind.

1959 haben dann BLASS, ANDERSON und CALVIN nach einer einstündigen Belichtung von *Chlorella* und *Scenedesmus* eine Abnahme des Xanthophylls Violaxanthin beobachtet, was die Autoren zur Aufstellung eines mehr hypothetischen Schemas über Umwandlungsmöglichkeiten der Carotinoide ineinander bewog. SAPOZHNIKOV et al. berichteten 1959 (b) und in mehreren weiteren Arbeiten (1959—1965) ebenso wie SAAKOV (1963—1966) von einer lichtinduzierten Umwandlung des Violaxanthins in das Lutein und in andere Carotinoide. Untersuchungen von YAMAMOTO et al. (1962c) an Blättern von *Spinacia oleracea* und *Phaseolus leunatus* führten dagegen zu dem Ergebnis, daß das im Licht abnehmende Violaxanthin nicht in das Lutein, sondern in das Zeaxanthin umgewandelt wird.

In jüngster Zeit haben KRINSKY (1964) und BAMJI u. KRINSKY (1965) in *Euglena* unter anaeroben Bedingungen ebenfalls eine Umwandlung des dort vorkommenden Monoepoxyds Antheraxanthin in Zeaxanthin beobachtet.

In der vorliegenden Arbeit werden nun mit Hilfe neuer dünn-schicht-chromatographischer Methoden (HAGER u. MEYER-BERTENRATH, 1966 und 1967) quantitative Untersuchungen über die lichtinduzierte Xanthophyllumwandlung an *Chlorella* und Spinatblättern durchgeführt. Es wird gezeigt, daß die Umwandlung Violaxanthin  $\rightarrow$  Antheraxanthin  $\rightarrow$  Zeaxanthin im Zusammenhang mit Elektronentransport-Vorgängen bei der Photosynthese steht und daß eine lichtunabhängige sauerstoffbedürftige Rückumwandlung Zeaxanthin  $\rightarrow$  Antheraxanthin  $\rightarrow$  Violaxanthin eine größere Akkumulation von Zeaxanthin normalerweise verhindert (s. auch HAGER 1966).

### Methodik

Die Anzucht von *Chlorella pyrenoidosa* (Stamm München, Nr. 10) erfolgte in der Nährlösung nach RUPPEL (1962) in einem Thermostat bei 20° C und einer Lichtintensität (Leuchtstofflampen) von etwa 3000 Lux, bei den anfänglichen Versuchen im Dauerlicht, später im Tag/Nacht-Rhythmus von 16:8 Std. Die Kulturen wurden mit Luft durchströmt.

Vor der Verwendung wurden die Algen von der Nährlösung abzentrifugiert und das Algensediment in Phosphatpuffer (pH 6,0, wenn nicht anders vermerkt) aufgenommen; jeweils 10 ml von dieser Suspension wurden für die Belichtungsversuche in Fernbach-Kolben oder Erlenmeyer-Kolben mit einem Bodendurchmesser von etwa 9 cm gegeben und von unten belichtet.

Spinat der Sorte „Matador“ wurde im Gewächshaus oder im Freiland angezogen. Aus den Blättern wurden Scheibchen mit einem Durchmesser von 1,9 cm oder 1,3 cm ausgestanzt. Jeweils 7—10 Scheibchen (Durchmesser 1,9 cm) bzw. 12—15 Scheibchen (Durchmesser 1,3 cm) wurden mit der Unterseite nach oben in die erwähnten Glasgefäße gebracht.

Die Belichtung des Pflanzenmaterials erfolgte in den Glasgefäßen in einem Licht-Warburg-Apparat, Modell PL 85 der Fa. B. Braun, Melsungen. Die Wassertemperatur wurde mit einem Kryostaten auf 20° C eingestellt. Als Lichtquelle diente eine Xenon-Hochdrucklampe XBF 1000 W/1 mit Wasserkühlung (Kühlmantel aus Glas), die in einem Reflektor unterhalb des Warburg-Apparates angebracht war. Als Rotfilter wurde eine Plastikplatte „rot, Nr. 501“, Dicke 3 mm, der Fa. Röhm & Haas, Darmstadt, verwendet, welche in einem besonderen Gehäuse durch Wasser gekühlt wurde. Dieses Filter ist nur durchlässig für eine Wellenlänge  $> 600$  nm. Die Extraktion, Auftrennung und quantitative Bestimmung der Pigmente erfolgte nach den bei HAGER und MEYER-BERTENRATH (1966 u. 1967) angegebenen Methoden.

Die verschiedenen Hemmstoffe und Substanzen wurden zur *Chlorella*-Suspension meist 15 min, CCCP 30 min und SA bis zu 60 min vor der Belichtung zugesetzt. CCCP wurde in einer Konzentration von  $10^{-3}$  M in  $10^{-2}$  molarer NaOH in Lösung gebracht.

### Ergebnisse

*Der zeitliche Verlauf der Pigmentänderungen bei Chlorella in Weißlicht („Hin-Reaktion“).* Aus Abb. 1 wird ersichtlich, daß in *Chlorella* das

Xanthophyll Violaxanthin bereits nach 2 min Belichtung abzunehmen beginnt. Diese Abnahme setzt sich bis etwa 30 min weiter fort. Umgekehrt nimmt das Xanthophyll Zeaxanthin zu, während das Xanthophyll Antheraxanthin nur anfänglich einen Mengenanstieg zeigt. Nach einer halbstündigen Belichtung scheint sich ein neues Gleichgewicht eingestellt zu haben, die Mengenänderungen kommen zum Stillstand.

Im Gegensatz zu den genannten 3 Farbstoffen bleiben die anderen Carotinoide und Chlorophylle während der Belichtung, die bis zu 90 min ausgedehnt wurde, nahezu unverändert (Abb. 2). Lediglich beim Chlorophyll a beginnt sich nach etwa 1 Std Belichtung eine photooxidative

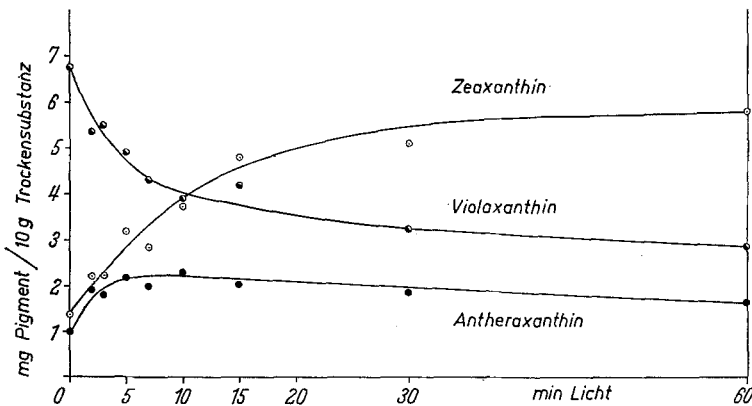


Abb. 1. Die Änderungen in den Konzentrationen der Xanthophylle Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin von *Chlorella pyrenoidosa* (Stamm München, Nr. 10) während der Belichtung mit Weißlicht ( $500\,000 \text{ erg/cm}^2 \times \text{sec}$ )

Zerstörung bemerkbar zu machen. Bei kurzzeitiger Belichtung lassen sich also Mengenänderungen nur bei Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin feststellen. Die gegenläufigen Kurven beweisen, daß aus dem Diepoxyd Violaxanthin durch Licht zunächst ein Epoxyd-Sauerstoff abgespalten wird (s. Abb. 15), es entsteht als Zwischenprodukt das Monoepoxyd Antheraxanthin und schließlich das epoxydfreie Zeaxanthin. Es handelt sich demnach um eine lichtbedingte Reduktion.

*Die Hin-Reaktion im Rotlicht.* Die Umwandlung Violaxanthin  $\rightarrow$  Zeaxanthin vollzieht sich auch bei einer Lichtfrequenz, welche von den gelben Xanthophyllen selbst nicht absorbiert werden kann. Obgleich die Lichtintensität des Rotlichts ( $150\,000 \text{ erg/cm}^2 \times \text{sec}$ ) wesentlich geringer war als die des Weißlichts ( $500\,000 \text{ erg/cm}^2 \times \text{sec}$ ) ist die lichtbedingte Abnahme des Violaxanthins und die Zunahme des Zeaxanthins im Rotlicht nicht sehr viel kleiner (Abb. 3). Es muß daraus gefolgert werden, daß als Lichtacceptor für die Xanthophyllumwandlung das Chlorophyll fungiert.

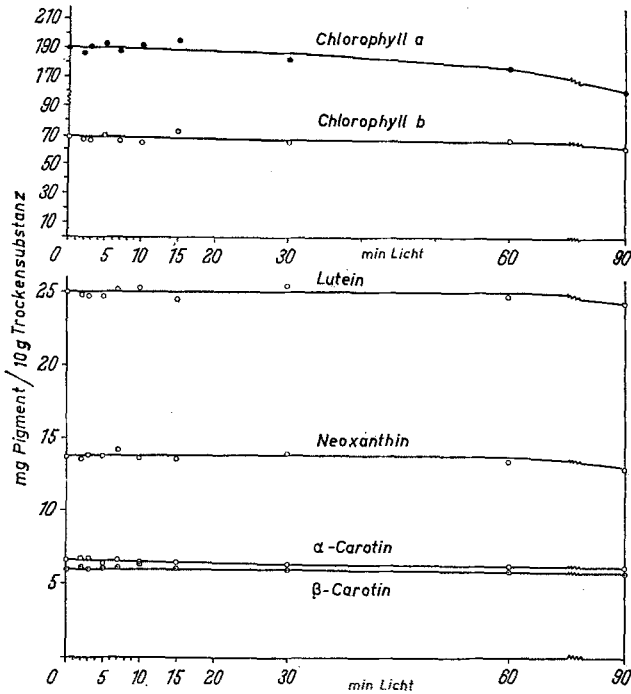


Abb. 2. Im Unterschied zu den in Abb. 1 aufgeführten Xanthophyllen bleiben die übrigen Carotinoide und Chlorophylle von *Chlorella pyrenoidosa* bei Belichtung mit Weißlicht in ihren Konzentrationen nahezu unverändert. Jeder Punkt stellt den Durchschnittswert von 4—6 Analysen dar

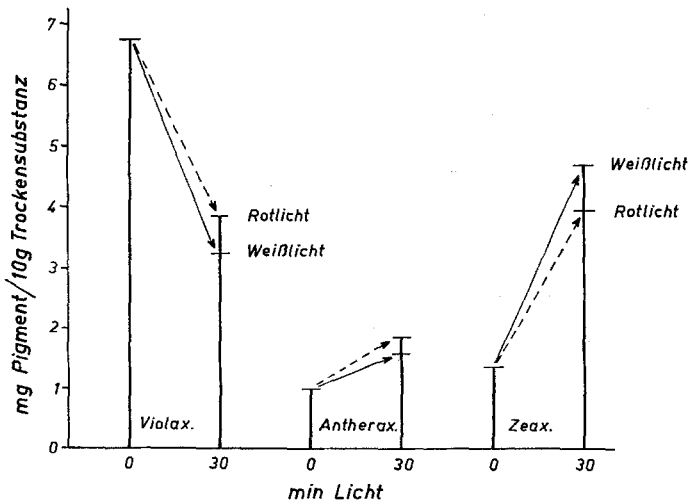


Abb. 3. Die Konzentrationsänderungen der Xanthophylle Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin in *Chlorella* bei Belichtung mit Weißlicht ( $500000 \text{ erg/cm}^2 \times \text{sec}$ ) bzw. Rotlicht ( $150000 \text{ erg/cm}^2 \times \text{sec}$ )

Der zeitliche Verlauf der Pigmentänderungen von *Spinacia oleracea* unter dem Einfluß von Rotlicht. Bei den Xanthophyllen von Spinatblättern lassen sich, ähnlich wie in *Chlorella*, durch Weißlicht und durch Rotlicht Mengenänderungen induzieren. In der Abb. 4 wird die Kinetik der Hin-Reaktion in Rotlicht gezeigt. Die Abnahme des Violaxanthins und die Zunahme des Zeaxanthins erfolgt hier noch drastischer als bei

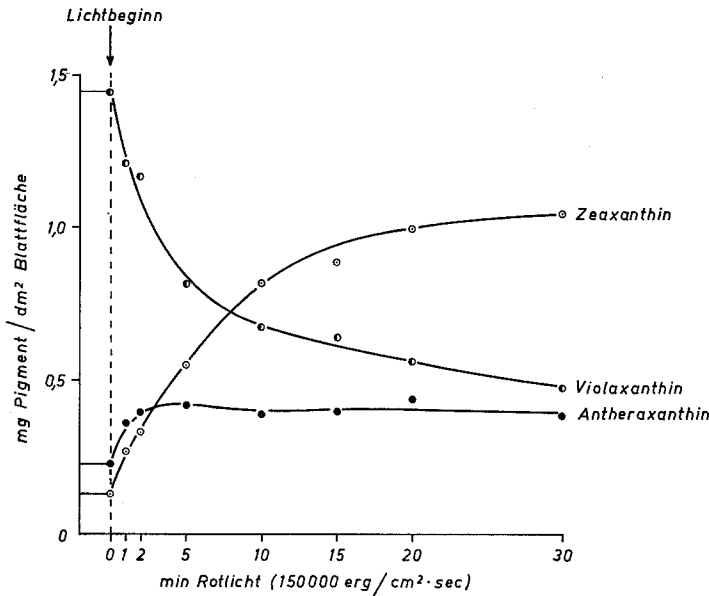


Abb. 4. Die Änderungen in den Konzentrationen der drei Xanthophylle Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin in Spinatblättern bei Belichtung mit Rotlicht. Die einzelnen Punkte stellen Durchschnittswerte von 5–8 Analysen dar

*Chlorella*. Bereits nach einminütiger Belichtungszeit hat sich der Zeaxanthingehalt verdoppelt. Die Tabelle I zeigt, daß die übrigen Carotinoide und Chlorophylle während der Belichtung keinerlei Konzentrationsänderungen aufweisen.

Auch in Spinatblättern bewirkt also das vom Chlorophyll absorbierte Licht die Abspaltung des Epoxydsauerstoffs vom Violaxanthin.

Der Einfluß kurzzeitiger Erhitzung auf die lichtbedingte Xanthophyllumwandlung in *Chlorella*. Wird eine *Chlorella*-Suspension, die einige Sekunden auf 100° C erhitzt worden war, belichtet, so lassen sich bei den Xanthophyllen keine gegenläufigen Mengenänderungen mehr feststellen. Der in Abb. 5 sichtbare geringe Anstieg der drei Xanthophylle nach der Belichtung ist nur scheinbar und hat seine Ursache in der Verminderung des als Bezugsgröße gewählten Trockengewichts durch Substanzverluste der erhitzten Zellen an die Außenlösung.

Der Versuch zeigt, daß die Abspaltung des Epoxyd-Sauerstoffs vom Violaxanthin im Licht kein einfacher physikalisch-chemischer Prozeß ist, vielmehr müssen zum Ablauf der Reaktion im Licht unverletzte Proteinstrukturen, intakte Elektronentransportketten oder Enzyme vorhanden sein. Diese Annahme wird unterstützt durch die Tatsache, daß Violaxanthin in Lösung bei Belichtung mit und ohne Chlorophylle unter keinen Umständen in Zeaxanthin umgewandelt werden kann. Die Befunde stimmen mit denen von BAMJI und KRINSKY (1965) überein, die

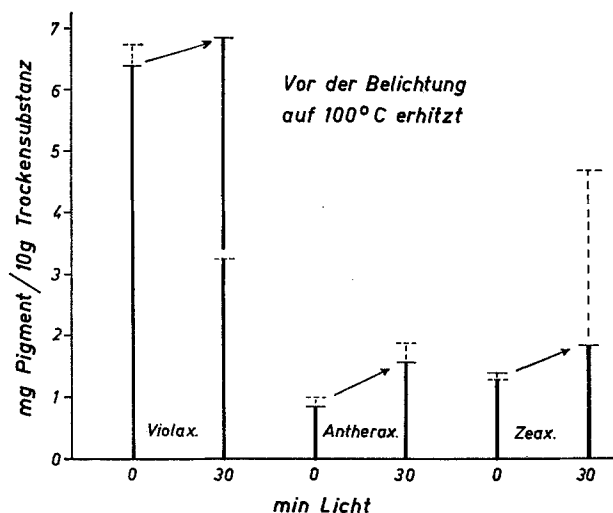


Abb. 5. Bei Belichtung von Chlorellen, die vorher erhitzt worden waren, zeigen die Xanthophylle keine gegenläufigen Konzentrationsänderungen mehr (Pfeile). Die gestrichelten horizontalen Balken stellen die Werte für die nicht erhitzten Kontrollen dar

an lyophilisierten Euglenazellen eine offensichtlich enzymatische Umwandlung von Antheraxanthin in Zeaxanthin beobachteten.

Tabelle 1. Die Konzentration der Chlorophylle und der in Abb. 4 nicht angeführten Carotinoide aus Blättern von *Spinacia oleracea* während der Belichtung mit Rotlicht. Es sind keine wesentlichen Mengenänderungen festzustellen

	Min Rotlicht (150 000 erg/cm <sup>2</sup> × sec)							
	0	1	2	5	10	15	20	30
Chlorophyll a	17,95	16,25	18,39	18,87	17,99	16,67	15,92	15,96
Chlorophyll b	5,71	5,21	6,02	6,13	5,64	5,23	5,02	4,92
β-Carotin	1,51	1,54	1,56	1,49	1,50	1,48	1,43	1,40
Lutein	2,36	2,32	2,49	2,37	2,32	2,26	2,23	2,19
Neoxanthin	0,83	0,84	0,92	0,84	0,83	0,83	0,82	0,76
mg Pigment/dm <sup>2</sup> Blattfläche								

Tabelle 2

Die Pigmentkonzentrationen in *Chlorella pyrenoidosa* (Stamm München, Nr. 10)  
 a = Vor dem Erhitzen auf 100° C; b = nach dem Erhitzen; c = nach dem Erhitzen und anschließender Belichtung (30 min Weißlicht); d = in nicht erhitzten und 30 min belichteten Zellen (Weißlicht)

	a	b	c	d
Chlorophyll a	190,00	180,04	123,08	183,54
Chlorophyll b	68,68	60,43	57,84	66,06
$\alpha$ -Carotin	6,60	6,75	2,62	6,30
$\beta$ -Carotin	5,96	5,87	1,94	5,95
Lutein	25,03	24,96	21,93	25,40
Neoxanthin	13,74	13,94	12,96	13,91
	mg/10 g Trockensubstanz			

In Tabelle 2 sind die Pigmentmengen der nicht im Diagramm (Abb. 5) aufgeführten Farbstoffe von *Chlorella* dargestellt. Aus diesen Zahlenwerten läßt sich noch eine wichtige Tatsache ablesen. Wenn man von der reduktiven Umwandlung Violaxanthin  $\rightarrow$  Zeaxanthin bei Belichtung absieht, finden bei den restlichen Farbstoffen keine weiteren lichtbedingten Veränderungen statt, vorausgesetzt, die Zellen sind intakt (vgl. Tabelle 2, Spalte a und d). Werden sie dagegen durch kurzes Erhitzen geschädigt oder abgetötet, so ist bei Belichtung eine starke photooxidative Zerstörung, vor allem von Chlorophyll a und den Carotinen zu beobachten (vgl. Spalte b und c). Chlorophyll b und die übrigen Xanthophylle sind weniger empfindlich.

Ähnliche Pigmentabbauerscheinungen sind auch an lebenden Pflanzen bei längerer starker Belichtung nachgewiesen worden (EGLE, 1944; HAGER, 1957; SIRONVAL u. KANDLER, 1958). Dagegen sind innerhalb kurzer Belichtungszeiten in intakten Geweben und im Normalfall, d.h. bei nicht extrem photolabilen Pflanzen noch keine Pigmentänderungen durch Photooxidationen zu beobachten. Die Abnahme des Verhältnisses Carotin/Xanthophyll tritt also erst sekundär in Erscheinung und kann deshalb nicht mit den schnellen Vorgängen bei der Hill-Reaktion in Zusammenhang gebracht werden. Die mehrfach geäußerte Meinung, daß die Änderung dieses Quotienten auf die Bedeutung dieser Farbstoffe als Redox-Substanzen bei der Photosynthese hinweisen (LUNDEGÅRDH, 1964, 1966) kann schon aus diesen Gründen nicht richtig sein.

*Die Beeinflussung der Xanthophyll-Umwandlung  
 durch Hemmstoffe der photosynthetischen Lichtreaktionen*

Um eine mögliche Abhängigkeit der Violaxanthin  $\rightarrow$  Zeaxanthin-Umwandlung von Vorgängen bei der Hill-Reaktion zu ergründen, wurden zu *Chlorella* verschiedene Substanzen zugegeben, die in verschiedener



Weise die Photosynthese beeinflussen können. In den im folgenden aufgeführten Diagrammen und Tabellen werden nur die drei sich ändernden Xanthophylle angeführt, obgleich bei jedem Versuch sämtliche andere Farbstoffe quantitativ mit erfaßt worden sind und damit eine ständige Kontrolle über ihre Mengenkonzanz bestand.

*o-Phenanthrolin* ist ein Chelatbildner, der die sauerstoffentwickelnde zweite Lichtreaktion bei der Photosynthese hemmt (LOSADA und ARNON, 1963; KESSLER, 1960), der aber auch die cyclische Photophosphorylierung, die durch FMN katalysiert wird, erniedrigt (WHATLEY et al., 1959). Bekanntlich wirkt *o-Phenanthrolin* auch hemmend auf die oxidative Phosphorylierung; dabei wird ein offensichtlich nicht häm-gebundenes Eisen, das sich in einem Hochenergie-Zwischenprodukt befinden soll, inaktiviert (BUTOW und RACKER, 1965).

Neben der Bindung von Schwermetallen an das *o-Phenanthrolin* ist aber auch die von Mg nachgewiesen worden (WARBURG und JENTSCHMANN, 1962), wodurch Mg-bedürftige Phosphorylierungsvorgänge gehemmt werden können.

Wie Abb. 6 zeigt, wird in *Chlorella* die lichtinduzierte Violaxanthin  $\rightarrow$  Zeaxanthin-Umwandlung vollständig unterbunden.

*Salicylaldoxim* hemmt in Chloroplasten die Hill-Reaktion. Nach der bisherigen Auffassung sollte durch diese Substanz eine Blockierung des Elektronentransportes am Plastocyanin eintreten (TREBST, 1963; TREBST et al., 1963; FORK und URBACH, 1965). KROGMANN und LIGHTBODY (1966) sind jedoch der Auffassung, daß diese Hemmung nicht durch eine Komplexbildung des SA mit dem Plastocyanin hervorgerufen wird; eine ähnliche Auffassung vertreten in ihrer jüngsten Arbeit auch KATOH und SAN PIETRO (1966), welche darin zeigen, daß die Reaktion des SA mit dem Cu des Plastocyanins zu langsam abläuft.

Aus der Abb. 6 ist zu ersehen, daß SA in einer Konzentration von  $10^{-2}$  m auf die Xanthophyllumwandlung in intakten *Chlorellen* nicht wirkt (im Unterschied zur Wirkung von SA in Chloroplasten; HAGER, unveröffentlicht); möglicherweise wird das aufgenommene Salicylaldoxim hydroxyliert und als Hemmstoff inaktiviert, wie das in Chloroplasten von TREBST und ECK (1963) unter aeroben Bedingungen nachgewiesen worden ist.

*Hydroxylamin* ist ein seit langem verwendeter Hemmstoff der Photosynthese (s. KESSLER, 1960, S. 926 und 955; LOSADA und ARNON, 1963, S. 572), der auf die  $O_2$ -Entwicklung wirkt, der aber die Photo-reduktion z.B. bei *Scenedesmus* und bei Purpurbakterien wenig beeinflusst. GAFFRON (1944) nahm aus diesen Gründen sogar eine spezifische Blockierung beim letzten Schritt der  $O_2$ -Freisetzung an. SAPOZHNIKOV et al. (1959a) haben mit Hydroxylamin eine Bildung des Luteins (ist

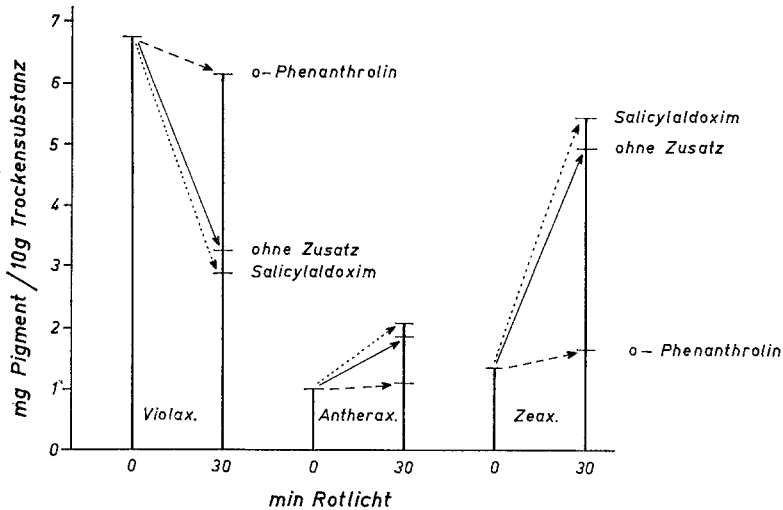


Abb. 6. Die Wirkung von *o*-Phenanthrolin ( $10^{-4}$  m) und Salicylaldoxim ( $10^{-2}$  m) auf die lichtbedingten Xanthophyllumwandlungen in *Chlorella pyrenoidosa*

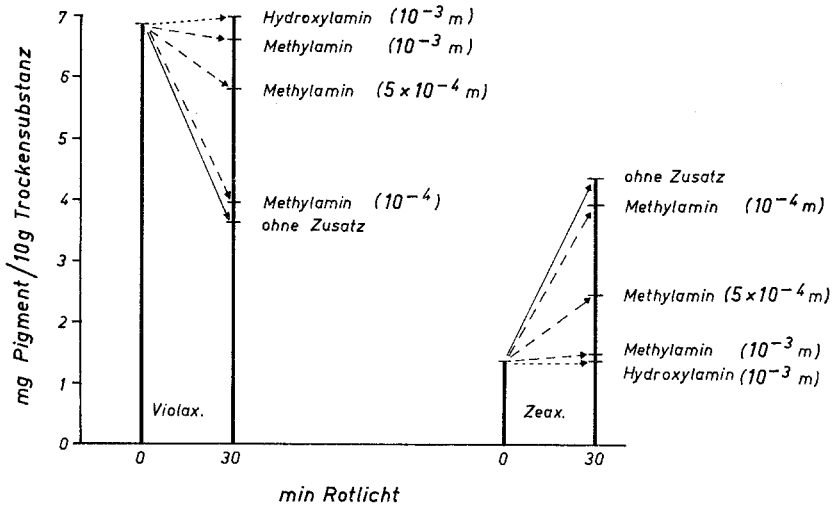


Abb. 7. Die Wirkung von Hydroxylamin (Algensuspension in Phosphatpuffer pH 7,0) und von Methylamin (Trispuffer pH 7,0) auf die Xanthophyllumwandlung in Rotlicht bei *Chlorella pyrenoidosa*

wahrscheinlich Zeaxanthin!) aus Violaxanthin im Licht hemmen können, allerdings nur unter aeroben Bedingungen.

In einer Konzentration von  $10^{-3}$  m unterdrückt Hydroxylamin die lichtinduzierte Umwandlung Violaxanthin  $\rightarrow$  Zeaxanthin unter aeroben und anaeroben Bedingungen vollständig (Abb. 7).

*Methylamin* ist verschiedentlich als Phosphorylierungs-Entkoppler in Chloroplasten verwendet worden (z. B. IZAWA, 1965; IZAWA und GOOD, 1965b). Es entkoppelt die offenkettige und cyclische Photophosphorylierung in Chloroplasten gleich stark (AVRON und SHAVIT, 1963, 1965). In *Chlorella* zeigt Methylamin ebenfalls eine Entkopplerwirkung; so haben MIFLIN und WHITTINGHAM (1966) eine Stimulierung der O<sub>2</sub>-Produktion und eine Hemmung der CO<sub>2</sub>-Fixierung beobachtet. Dabei kam es bei niederem CO<sub>2</sub>-Druck zu einer Anhäufung von Phosphoglycerinsäure und zu einer Abnahme sowohl der Zuckerdiphosphate als auch der Glycolsäure und des Glycins. Mit einer Konzentration von  $5 \times 10^{-4}$  m konnte die CO<sub>2</sub>-Fixierung vollständig unterdrückt werden. Die Versuche sind allerdings bei dem hohen pH von 9,8 durchgeführt worden.

Die lichtinduzierte Violaxanthin  $\rightarrow$  Zeaxanthin-Umwandlung läßt sich mit Methylamin  $\cdot$  HCl (pH 7, Tris-Puffer) ähnlich wie in Chloroplasten (HAGER, unveröffentlicht) in *Chlorella* schon bei einer Konzentration von  $5 \times 10^{-4}$  m sehr stark hemmen (Abb. 7).

*m-Chlorcarbonylcyanidphenylhydrazon (CCCP)* wird seit einiger Zeit auch bei der Photophosphorylierung als Entkoppler verwendet (HEYTLER und PRICHARD, 1962; AVRON und SHAVIT, 1963, 1965; BAMBERGER et al., 1963). Mit einer Konzentration von  $10^{-5}$  m hemmt es die Phosphorylierung, der Elektronentransport wird mit  $3 \times 10^{-5}$  m aber nur um 50% gehemmt (PLENGVIDHYA und BURRIS, 1965). DE KIEWIET et al. (1965) konnten mit CCCP in Chloroplasten die Phosphorylierung in drei cyclischen Systemen (PMS, Vitamin K<sub>3</sub> und FMN) und in drei nicht-cyclischen Systemen (Ferricyanid-H<sub>2</sub>O; NADP-H<sub>2</sub>O und NADP-AS) hemmen. Nur die Reduktion von NADP mit AS-DPIP als Elektronendonator war unbeeinflusst. Im PMS-System war die Hemmwirkung abhängig von der Lichtintensität: Bei steigender Intensität waren steigende Konzentrationen von CCCP notwendig, um eine Hemmung zu erzielen. Außerdem soll nach AVRON und SHAVIT (1963) die cyclische Photophosphorylierung weniger empfindlich gegen CCCP sein und erst bei höheren Konzentrationen gehemmt werden, als die nichtcyclische Phosphorylierung.

In *Chlorella* werden die O<sub>2</sub>-Entwicklung und die CO<sub>2</sub>-Fixierung mit einer Konzentration von  $10^{-5}$  m ebenfalls gehemmt (GOULD und BASSHAM, 1965).

Bei den eigenen Versuchen wird die Zeaxanthinbildung in *Chlorella* (pH 7, Phosphatpuffer) bei einer Konzentration von  $5 \times 10^{-5}$  m sehr stark und von  $10^{-4}$  m vollständig gehemmt (Abb. 8). In Chloroplasten wird die Zeaxanthinbildung schon bei Konzentrationen von  $10^{-6}$  m gehemmt und bei  $5 \times 10^{-6}$  m vollständig unterbunden (unveröffentlicht).

KCN hemmt die CO<sub>2</sub>-Assimilation, d. h. die Carboxylierungs-Reaktion in Chloroplasten (LOSADA, 1963, S. 565 und 582), hat aber im all-

gemeinen wenig Einfluß auf die Elektronentransport-Vorgänge (SIMONIS, 1960, S. 988 und 994) und die Photophosphorylierungen, mit Ausnahme einer durch FMN hervorgerufenen cyclischen Phosphorylierung (WHATLEY, 1959). Allerdings findet TREBST (1963) bei Konzentrationen, die höher als  $10^{-2}$  m liegen, eine Hemmung der  $O_2$ -Entwicklung mit Ferricyanid und eine Hemmung der cyclischen Photophosphorylierung mit Vitamin  $K_2$ . Bei Konzentrationen unter  $10^{-2}$  m wird jedoch nur die endogene Katalase gehemmt.

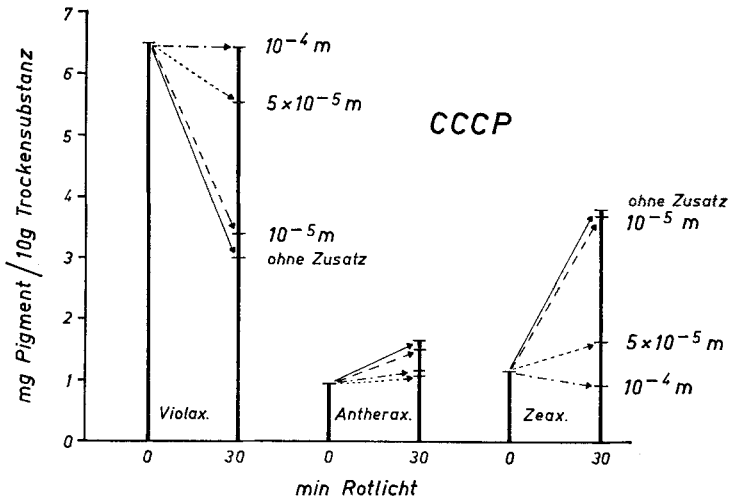


Abb. 8. Die Wirkung verschiedener Konzentrationen von CCCP auf die lichtbedingten Xanthophyllumwandlungen in *Chlorella pyrenoidosa* (Phosphatpuffer, pH 7,0)

Abb. 9 zeigt, daß KCN ( $10^{-2}$  m) die lichtbedingte Umwandlung der Xanthophylle nicht beeinflusst, ja diese sogar etwas zu fördern scheint, da die im Dunkeln ablaufende Rückumwandlung Zeaxanthin  $\rightarrow$  Violaxanthin durch KCN etwas gehemmt wird.

$N_2$ . Wird eine *Chlorella*-Suspension 20 min vor und während der Belichtung mit Stickstoff durchströmt, so erscheint die lichtinduzierte Violaxanthin  $\rightarrow$  Zeaxanthin-Umwandlung nicht allzu stark beeinflusst (Abb. 10). Da die gleichzeitig ablaufende Rückumwandlung Zeaxanthin  $\rightarrow$  Violaxanthin durch Stickstoff vollständig unterbunden wird (s. unten), wäre allerdings eine stärkere Anhäufung von Zeaxanthin im Licht zu erwarten; die Hin-Reaktion scheint also unter anaeroben Bedingungen nicht in voller Stärke ablaufen zu können. Die besonders starke Anhäufung des Zwischenproduktes Antheraxanthin ist wohl ein Zeichen für eine begrenzte Rückreaktion. Der erste Schritt Zeaxanthin  $\rightarrow$  Antheraxanthin scheint mit den Restmengen von Sauerstoff (die über die Gärungskohlensäure und die durch sie bedingte geringe Photosynthese

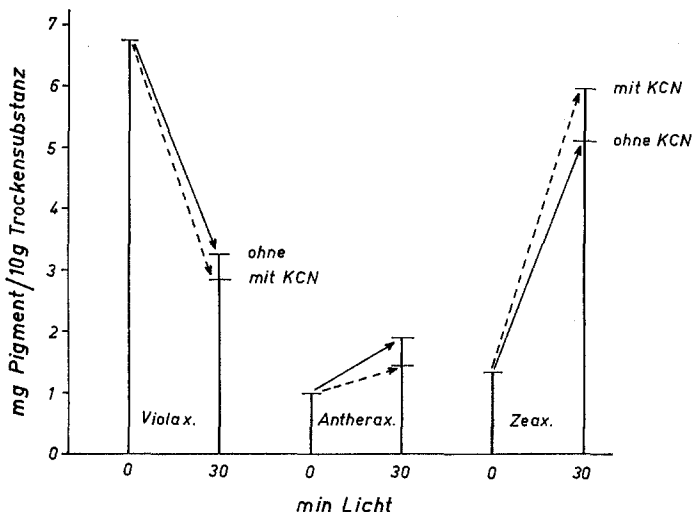


Abb. 9. Der Einfluß von KCN ( $10^{-2}$  m) auf die Xanthophyllumwandlungen in *Chlorella pyrenoidosa* im Weißlicht ( $500000 \text{ erg/cm}^2 \times \text{sec}$ )

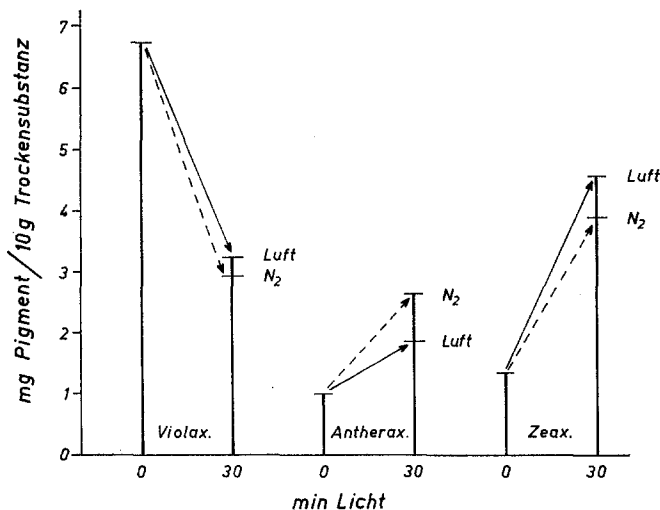


Abb. 10. Die lichtinduzierten Xanthophyllumwandlungen laufen unter anaeroben und aeroben Bedingungen ab. Weißlicht  $500000 \text{ erg/cm}^2 \times \text{sec}$ . Begasung der *Chlorella*-Suspension mit nachgereinigtem N<sub>2</sub> bzw. mit Luft 20 min vor und während der Belichtung

entstehen könnten) noch etwas besser abzulaufen als der zweite Schritt vom Antheraxanthin zum Violaxanthin.

DCMU, 3-(3',4'-dichlorophenyl)-1,1-dimethylharnstoff ist ein spezifischer Hemmstoff der Lichtreaktion II (LOSADA und ARNON, 1963, S. 572f.). Es ist freilich noch ungeklärt, ob der Elektronentransport

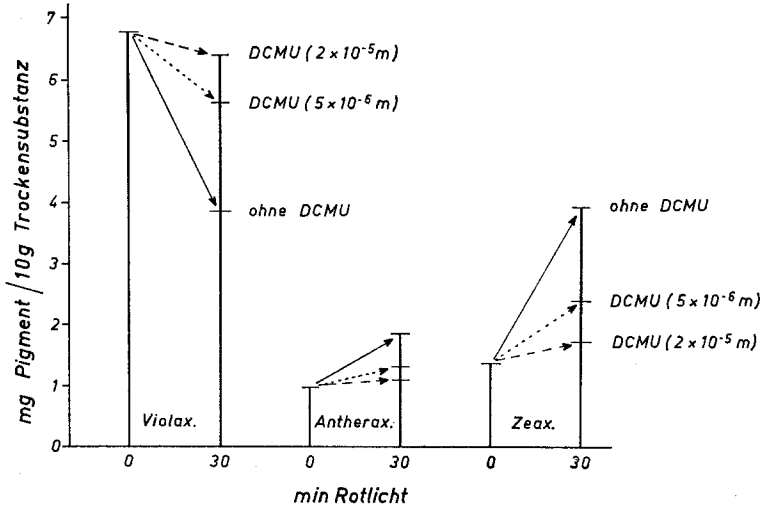


Abb. 11. Der Einfluß von DCMU auf die Xanthophyllumwandlungen in *Chlorella*. Rotlicht  $150000 \text{ erg/cm}^2 \times \text{sec}$

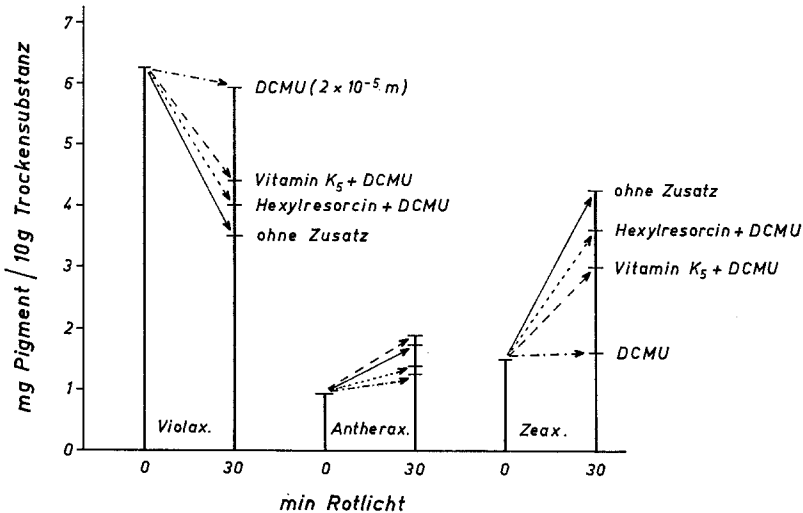


Abb. 12. Die Aufhebung der DCMU-gehemmten Xanthophyllumwandlungen durch Vitamin K<sub>5</sub> ( $10^{-4} m$ ) bzw. Hexylresorcin ( $2 \times 10^{-4} m$ )

zwischen dem  $H_2O$  und dem photooxidierten Chlorophyll  $a_{II}$  blockiert wird, oder an einem Quencher (DUYSENS und SWEERS, 1963), der das lichtangeregte Elektron vom Chlorophyll  $a_{II}$  empfängt (s. dazu RUMBERG et al., 1964, S. 1100; GINGRAS et al., 1965; IZAWA und GOOD, 1965a). SWEETSER postulierte 1963 eine Wechselwirkung oder Komplexbildung zwischen Monuron [3-(p-Chlorphenyl)-1,1-dimethylharn-

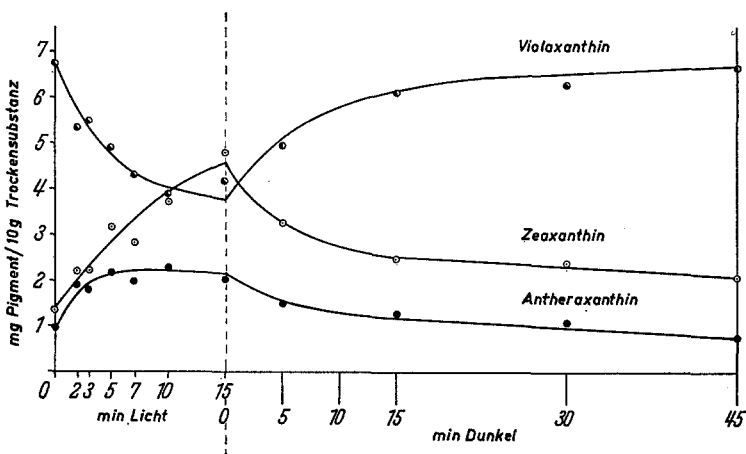


Abb. 13. Die zeitlichen Änderungen in den Konzentrationen der drei Xanthophylle von *Chlorella pyrenoidosa* während der 15minütigen Belichtung mit Weißlicht und nach dem Abschalten des Lichtes

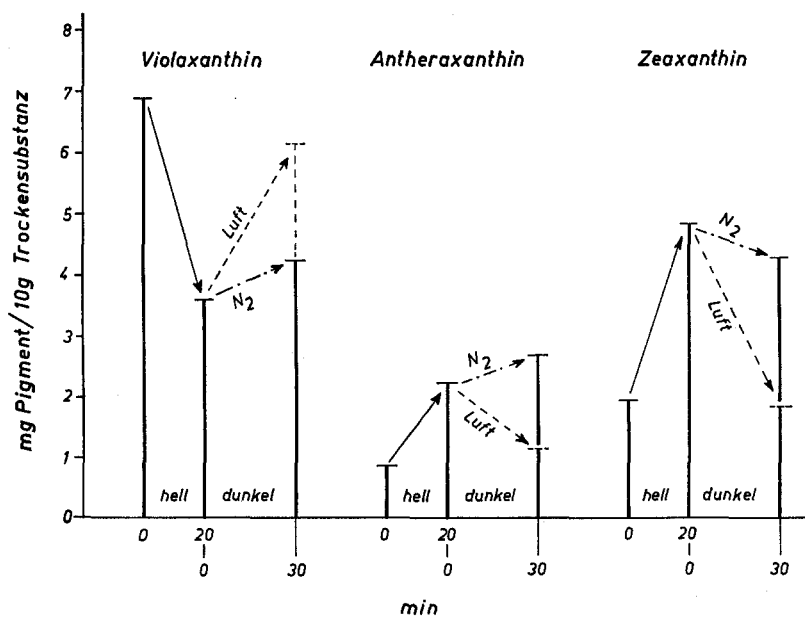


Abb. 14. Die Rückumwandlung von Zeaxanthin über Antheraxanthin in Violaxanthin wird nach dem Abschalten des Lichtes in N<sub>2</sub>-Atmosphäre gehemmt (20 min Weißlicht, 500 000 erg/cm<sup>2</sup> × sec; *Chlorella*)

stoff] und einem FMN oder einem Flavoprotein der Photosynthesekette, die letztlich zu einer Hemmung des Elektronentransports führen sollte.

DCMU unterdrückt die lichtinduzierte Zeaxanthinbildung in *Chlorella* sehr stark; allerdings ist die Hemmung bei einer Konzentration

von  $5 \times 10^{-6}$  m, welche die  $O_2$ -Entwicklung noch zu 93% hemmt, nur mehr etwa 70% (Abb. 11).

Die Hemmung der Zeaxanthinbildung durch DCMU ( $2 \times 10^{-5}$  m) im Licht kann aber durch solche Substanzen zum größten Teil wieder aufgehoben werden, welche die cyclische Photophosphorylierung, d.h. einen cyclischen Elektronentransport begünstigen. Vom Vitamin K sind solche Eigenschaften seit langem bekannt und in isolierten ganzen oder aufgebrochenen Chloroplasten nachgewiesen worden (ARNON et al., 1955). Aber auch in intakten Zellen, in *Chlorella* ist mit *Vitamin K<sub>5</sub>* (4-Amino-2-methyl-1-naphtholhydrochlorid) bzw. *Hexylresorcin* eine starke Förderung des cyclischen Elektronenflusses und eine dadurch bedingte Hemmung des nichtcyclischen Prozesses und der Sauerstoffentwicklung zu beobachten (GOULD und BASSHAM, 1965).

Abb. 12 zeigt, wie die durch DCMU verursachte Hemmung der Zeaxanthinbildung im Licht durch *Vitamin K<sub>5</sub>* ( $10^{-4}$  m) und *Hexylresorcin* ( $2 \times 10^{-4}$  m) wieder aufgehoben werden kann.

*Der zeitliche Verlauf der lichtabhängigen Rückumwandlung  
Zeaxanthin  $\rightarrow$  Violaxanthin in Chlorella*

Wie Abb. 13 deutlich macht, sind nach dem Abschalten des Lichts die Mengenänderungen der drei Xanthophylle rückläufig, d.h. es wird die ständig ablaufende Rückumwandlung Zeaxanthin  $\rightarrow$  Violaxanthin sichtbar; die Verschiebung des Gleichgewichts durch das Licht in Richtung Zeaxanthin (s. Abb. 15) wird wieder aufgehoben.

Diese Rückreaktion wird beim Fehlen des Luftsauerstoffs fast vollständig unterbunden (Abb. 14). Für den Einbau von Sauerstoff in die Iononringe des Zeaxanthins ist möglicherweise eine metallhaltige Oxygenase verantwortlich (s. HAGER, 1966).

### Diskussion

Die in den Blättern und Algen bei Belichtung einsetzende Abnahme des Violaxanthins und die gleichzeitige Zunahme des Zeaxanthins ist im Dunkeln reversibel; das bedeutet, daß die Abspaltung des Epoxyd-Sauerstoffs aus dem Violaxanthin und damit die Bildung des epoxydfreien Zeaxanthins ein umkehrbarer Vorgang ist (Abb. 15). Die Zeaxanthinbildung hat dabei reduktiven Charakter; sie beginnt im Licht ohne „lag-phase“ und ist schon nach einminütiger Belichtung chromatographisch nachzuweisen. Sie unterscheidet sich auch dadurch von den photooxidativen Pigmentveränderungen, die unter den gegebenen Bedingungen und in den intakten Zellen erst nach Stunden in Erscheinung treten und die sich durch Zerstörung vor allem des Chlorophylls a und der Carotine bemerkbar machen. In geschädigten Zellen können solche photooxidativen Veränderungen allerdings schon nach viel kürzerer Zeit



stattfinden (s. Tabelle 2). Sie führen zur Erhöhung des Verhältnisses Xanthophylle/Carotine.

Als Zwischenprodukt bei der lichtinduzierten Umwandlung Violaxanthin  $\rightarrow$  Zeaxanthin fungiert Antheraxanthin (Abb. 15), das zu Beginn der Belichtung einen deutlichen Mengenanstieg zeigt (Abb. 1 und 4). Alle anderen Carotinoide ändern ihre Konzentration bei der angewendeten Lichtintensität und Versuchszeit (bis zu 1 Std) nicht.

Dies gilt auch für das Neoxanthin, von dem man auf Grund seiner 5-hydro-6-hydroxy-Konfiguration am Ionon-Ring I vermutet hat (SAAKOV, 1965a; BAMJI und KRINSKY, 1965), daß es eine Zwischenstufe darstellt, wenn der 5,6-Epoxydsauerstoff vom Iononring des Violaxanthins

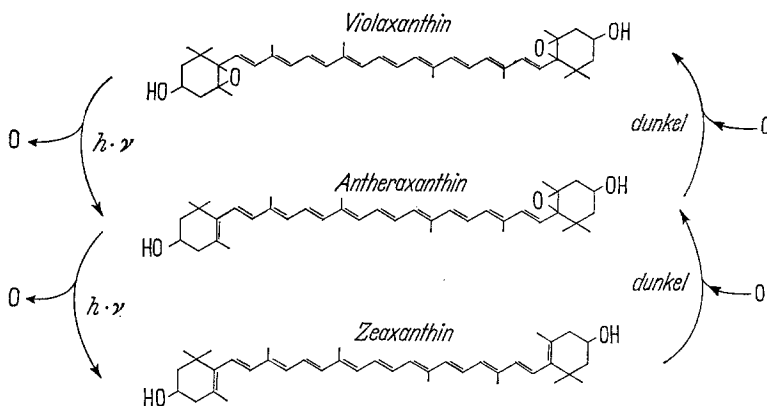


Abb. 15. Die Konstitution der drei Xanthophylle, die sich in der lichtinduzierten Hin-Reaktion und der lichtunabhängigen Rückreaktion ineinander umwandeln

abgespalten wird und an dieser Molekülstelle eine Doppelbindung entsteht. Bei den durchgeführten Versuchen konnte keine signifikante Ansammlung oder Abnahme von Neoxanthin beobachtet werden; für die Funktion des Farbstoffes als Zwischenprodukt waren somit keine Anhaltspunkte zu finden.

Wie der Kurvenverlauf (Abb. 1 und Abb. 4) zeigt, kommen die Mengenänderungen der drei Xanthophylle während der Belichtung nach 20—30 min zum Stillstand. Es stellt sich offensichtlich ein neues Gleichgewicht mit der ständig ablaufenden Rückumwandlung Zeaxanthin  $\rightarrow$  Violaxanthin ein; diese Rückreaktion wird sichtbar, wenn das Licht abgeschaltet wird (Abb. 13).

Die Konzentrationen der drei Xanthophylle, die in den Blättern oder Algen festgestellt werden, geben somit nur Auskunft über den augenblicklichen Gleichgewichtszustand zwischen Hin- und Rückreaktion (s. Abb. 15). Zu einer Akkumulation von Zeaxanthin kann es nur dann kommen, wenn die Hin-Reaktion im Vergleich zur Rückumwandlung

relativ zu schnell abläuft. Dies kann eintreten, wenn die Lichtintensität sehr hoch ist (wie das in der freien Natur sehr häufig der Fall ist); oder wenn bei geringer Lichteinstrahlung die Rückreaktion von Zeaxanthin zu Violaxanthin entweder durch Anaerobiose oder durch bestimmte Gifte gehemmt wird.

Daraus wird verständlich, warum in schwachem Licht und bei Anwesenheit von Sauerstoff unter Umständen kein Zeaxanthin beobachtet werden kann; dies erklärt ferner, warum bisher fälschlicherweise angenommen wurde (SAPOZHNIKOV, 1959b; YAMAMOTO et al., 1962c), die lichtinduzierte Umwandlung Violaxanthin  $\rightarrow$  Zeaxanthin bzw. Antheraxanthin  $\rightarrow$  Zeaxanthin in *Euglena* (KRENSKY, 1964) könne nur bei Abwesenheit von Sauerstoff, also unter nicht-physiologischen Bedingungen ablaufen. Tatsächlich wird aber durch Stickstoff nur die ständig ablaufende Rückreaktion gehemmt und dadurch die Zeaxanthinbildung sichtbar gemacht; die Lichtreaktion läuft, wie die Versuche zeigen, in Luft und Stickstoff in gleicher Weise ab.

Die Versuche mit Rotlicht beweisen ferner, daß die Lichtumwandlung der Xanthophylle auch bei einer Lichtfrequenz abläuft, die von den Carotinoiden selbst nicht absorbiert werden kann. Als Lichtacceptor für diese Umwandlungsreaktion fungiert das Chlorophyll. Daraus erhebt sich die Frage, ob die lichtbedingte Epoxydabspaltung vom Violaxanthin etwas mit der Photosynthese oder der Hill-Reaktion zu tun hat.

Über eine Beteiligung der Xanthophylle beim  $O_2$ -Transport oder der  $O_2$ -Freisetzung in grünen Blättern ist schon seit langem spekuliert worden (DOROUGH und CALVIN, 1951; CHOLNOKY et al., 1956; SAPOZHNIKOV et al., 1957). Die Untersuchungen, die mit  $^{18}O$  durchgeführt worden sind, haben jedoch zu widersprechenden Ergebnissen und Deutungen geführt. Im folgenden wird gezeigt, daß sich diese Widersprüche mit Hilfe der eigenen Befunde erklären lassen. YAMAMOTO et al. (1962b) fanden, daß in *Chlorella vulgaris* im Dunkeln ein Einbau von Sauerstoff in die Hydroxyl-Gruppen erfolgen kann, daß aber der Sauerstoff der Epoxyd-Gruppen aus dem  $H_2O$  stamme. Um nun eine Beteiligung der Xanthophylle bei der  $O_2$ -Entwicklung während der Photosynthese zu prüfen, haben diese Autoren (YAMAMOTO et al., 1962a) in isolierten Chloroplasten einen möglichen Einbau von  $^{18}O$  aus  $H_2^{18}O$  in die Xanthophylle untersucht. Es ließ sich aber kein erhöhter  $^{18}O$ -Einbau nachweisen; die Autoren folgerten, daß die Epoxydpigmente keine Funktion beim  $O_2$ -transportierenden System während der Photosynthese haben.

Zu demselben Ergebnis kamen SHNEOUR und CALVIN (1962) welche mit einer „Quantasomen-Fraktion“ aus *Spinacia oleracea*-Chloroplasten arbeiteten. Weder aus  $H_2^{18}O$  noch aus einem Gasgemisch mit 20%  $^{18}O$  in Argon wurde im Licht mehr  $^{18}O$  in das Violaxanthin oder Lutein eingebaut als im Dunkeln.

Diese Ergebnisse sind nach Abb. 15 verständlich, denn ein  $^{18}\text{O}$ -Einbau in die Xanthophylle könnte nur während der Rückreaktion erfolgen; da aber in isolierten Chloroplasten unter keinen Umständen eine Rückreaktion nachzuweisen ist (HAGER, unveröffentlicht), ist das negative Ergebnis erklärlich.

Anders müssen dagegen die Ergebnisse in intakten Pflanzenteilen mit einer gut funktionierenden Rückreaktion ausfallen. Bereits 1961 haben SAPOZHNIKOV et al. den Einbau von  $^{18}\text{O}$  aus  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  in intakten Pflanzen von *Elodea canadensis* und *Chlorella pyrenoidosa* untersucht. Es wurden Belichtungszeiten von 15 min und 2 Std und verschiedene Dunkelperioden angewendet. Im Licht wurde in das Violaxanthin  $^{18}\text{O}$  aus dem  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  eingebaut, im Dunkeln geschah dies nicht. In einer neueren Arbeit (SAPOZHNIKOV et al., 1965) konnten diese Ergebnisse bestätigt werden; es wurde nach einer 30minütigen Belichtung ein zweimal so großer Einbau von  $^{18}\text{O}$  aus  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  (73%  $^{18}\text{O}$ ) in das Violaxanthin gemessen.

Diese Befunde werden von den russischen Autoren als *Beweis für* die Beteiligung der Xanthophylle als Zwischenprodukte bei der Umwandlung des Wassersauerstoffs in molekularen Sauerstoff angesehen (SAAKOV, 1965 b).

Nach unseren Befunden müssen diese Ergebnisse aber so gedeutet werden, daß der bei der Photosynthese aus dem  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  freigesetzte  $^{18}\text{O}_2$  bei der Rückreaktion teilweise in Violaxanthin eingebaut wird und so dessen Markierung zustande bringt.

Für diese Erklärung spricht auch die Arbeit von YAMAMOTO und CHICHESTER (1965). Bohnenblätter, welche 30 min unter Stickstoff belichtet worden waren, wurden anschließend in eine  $^{18}\text{O}$ -Atmosphäre überführt und dort in Dunkelheit 30 min belassen. Es zeigte sich im Dunkeln eine beträchtliche  $^{18}\text{O}$ -Aufnahme in das Antheraxanthin (es wurde allerdings nur dieser sich im Dunkeln am stärksten vermehrende Farbstoff untersucht) und zwar spezifisch in die Epoxydgruppe mit einer dreimal höheren Einbaurate, verglichen mit dem Gesamtmolekül. Es wird angenommen, daß auch in das Violaxanthin in ähnlicher Weise  $\text{O}_2$  aufgenommen werden kann.

Damit ist wahrscheinlich gemacht, daß die reversiblen Xanthophyllumwandlungen nicht unmittelbar bei der  $\text{O}_2$ -Freisetzung während der Photosynthese beteiligt sind; eindeutige Beweise dafür ergeben sich nun aber bei den oben geschilderten Versuchen mit Hemmstoffen der Hill-Reaktion. Vor allem die Hemmung der Zeaxanthinbildung durch das hauptsächlich auf die Lichtreaktion II wirkende DCMU und die Möglichkeit, diese Hemmung durch Substanzen aufheben zu können, welche in *Chlorella* einen starken cyclischen Elektronentransport am Chlorophyll  $a_1$  hervorrufen können (Vitamin  $\text{K}_5$ , Hexylresorcin), spricht für

eine Nichtbeteiligung der Xanthophylle bei der  $O_2$ -Freisetzung. Die beiden Substanzen Vitamin  $K_5$  und Hexylresorcin sind allerdings nur dann für die Zeaxanthinbildung notwendig, wenn eine hohe DCMU-Konzentration ( $2 \times 10^{-5}$  m) verwendet wird, bei welcher auch der cyclische Elektronentransport bzw. die cyclische Photophosphorylierung in *Chlorella* um 80% gehemmt ist (gemessen an der Glucoseaufnahme von *Chlorella*; TANNER et al., 1965). Eine solche Hemmung der cyclischen Photophosphorylierung wurde auch von BOMSEL (1966) in vivo an

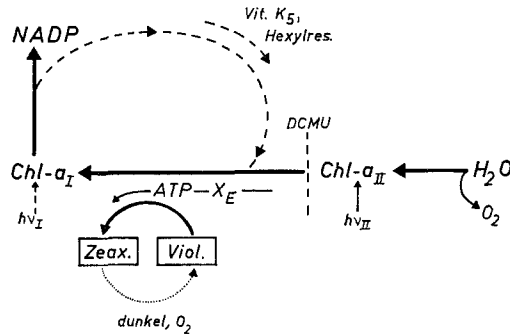


Abb. 16. Schema über die Kopplung der Violaxanthin  $\rightarrow$  Zeaxanthin-Umwandlung an die Elektronentransportvorgänge während der Photosynthese in *Chlorella*

Weizenblättern mit Monuron [3-(4'-Chlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff = CMU] bei einer Konzentration von  $2 \times 10^{-5}$  m aufwärts beobachtet.

Wird die DCMU-Konzentration jedoch niedriger gehalten ( $5 \times 10^{-6}$  m), so ist die photosynthetische  $O_2$ -Entwicklung zwar noch um 93% gegenüber der Kontrolle gehemmt (s. oben), die Zeaxanthinbildung dagegen aber nur um 70% (Abb. 11). Dies zeigt, daß die Lichtreaktion II im Normalfall als Elektronendonator in Tätigkeit sein muß, damit Zeaxanthin gebildet werden kann; wird Chlorophyll  $a_{II}$  blockiert (z. B. durch DCMU), kann dieser Elektronentransport durch ein cyclisches System über das Chlorophyll  $a_I$  ersetzt werden (Abb. 16). Es scheint also, daß ein Elektronenfluß vom Reduktant des Chlorophylls  $a_{II}$  (Plastoquinon) zum photooxydierten Chlorophyll  $a_I$  notwendig ist, damit Zeaxanthin entstehen kann.

Die bei diesem Elektronentransport stattfindende Violaxanthin  $\rightarrow$  Zeaxanthin-Umwandlung kann nun in *Chlorella* durch Phosphorylierungsentkoppler wieder gehemmt werden, wie das auch in Chloroplasten möglich ist (HAGER, 1966). Es muß deshalb angenommen werden, daß die Xanthophyllumwandlung an die Photophosphorylierungsvorgänge gekoppelt ist oder von ihnen abhängt (Abb. 16).

Ob zum Ablauf dieser Reaktion noch ein Reduktant notwendig ist, der vom lichtangeregten Chlorophyll  $a_{II}$  oder im Fall eines cyclischen Elektronentransports vom Chlorophyll  $a_I$  gebildet wird, kann aus diesen Versuchen noch nicht eindeutig abgeleitet werden.

Als sicher kann gelten, daß die Reduktanten NADPH oder FMNH, welche in lyophilisierten Zellen von *Euglena* eine Zeaxanthinbildung hervorrufen können (BAMJI und KRINSKY, 1965), in vivo und im Normalfall für die Xanthophyllumwandlungen unmittelbar nicht verantwortlich sind.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für Sachbeihilfen, Herrn Prof. Dr. A. TREBST für die Überlassung von DCMU.

### Zusammenfassung

1. Mit Hilfe neuer dünn-schichtchromatographischer Methoden wurden quantitative Untersuchungen über die lichtinduzierten Mengenänderungen der Xanthophylle in *Chlorella* und Spinatblättern durchgeführt und die möglichen Zusammenhänge dieser Mengenänderungen mit den Elektronentransport-Vorgängen bei der Photosynthese aufgezeigt.

2. Der zeitliche Verlauf dieser Xanthophyll-Umwandlungen wurde während starker Belichtung und in nachfolgender Dunkelheit (*Chlorella*) untersucht.

3. Die lichtinduzierte Violaxanthin  $\rightarrow$  Antheraxanthin  $\rightarrow$  Zeaxanthin-Umwandlung („Hin-Reaktion“) findet auch im Rotlicht ( $>600$  nm) statt. Als Lichtacceptor fungiert das Chlorophyll.

4. Diese Umwandlung hat nichts mit Pigmentveränderungen zu tun, die photooxydativer Natur sind, die erst nach längerer Belichtung in Erscheinung treten und die zu einer Erhöhung des Verhältnisses Xanthophylle/Carotine führen.

5. Die Hin-Reaktion unterbleibt nach kurzzeitiger Erhitzung der Zellen. Sie wird ferner durch Hemmstoffe der Lichtreaktion II bei der Photosynthese, nämlich o-Phenanthrolin, Hydroxylamin und DCMU vollständig unterbunden. Die Hemmung durch DCMU kann (in *Chlorella*) durch Substanzen wieder aufgehoben werden, welche einen cyclischen Elektronentransport am Chlorophyll  $a_I$  hervorrufen oder verstärken: Vitamin  $K_2$  und Hexylresorcin.

Im Unterschied zu Chloroplasten (unveröffentlicht) wird die Xanthophyllumwandlung durch den Kupfer-Komplexbildner Salicylaldehyd nur schwach gehemmt. Cyanid beeinflußt die Hin-Reaktion nicht. Sie läuft außerdem unter aeroben und anaeroben Bedingungen gleichermaßen ab.

Die Entkoppler CCCP und Methylamin unterbinden die lichtbedingte Zeaxanthin-Bildung bei Konzentrationen von  $10^{-4}$  bzw.  $5 \times 10^{-4}$  m bereits vollständig.

6. Die lichtunabhängige Rückumwandlung Zeaxanthin  $\rightarrow$  Antheraxanthin  $\rightarrow$  Violaxanthin verhindert normalerweise eine stärkere lichtinduzierte Ansammlung von Zeaxanthin; diese Rückumwandlung wird in einer  $N_2$ -Atmosphäre vollständig gehemmt. Unter solchen Bedingungen kann deshalb auch in schwachem Licht eine Akkumulation von Zeaxanthin beobachtet werden.

7. Die Ergebnisse zeigen, daß die lichtabhängige Violaxanthin  $\rightarrow$  Antheraxanthin  $\rightarrow$  Zeaxanthin-Umwandlung indirekt an einen Transport von Elektronen gekoppelt ist, welcher zwischen dem lichtreduzierten Plastochinon und dem lichtoxydierten Chlorophyll  $a_1$  abläuft; die bei diesem Elektronentransport gebildeten (energiereichen) Verbindungen oder das ATP selbst stehen in ursächlichem Zusammenhang mit der [O]-Abspaltung aus dem Violaxanthin und der daraus resultierenden Bildung von Zeaxanthin.

### Literatur

- ARNON, D. J., F. R. WHATLEY, and M. B. ALLEN: Vitamin K as a cofactor of photosynthetic phosphorylation. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **16**, 607—608 (1955).
- AVRON, M., and N. SHAVIT: In: *Photosynthetic mechanism of green plants*, p. 611 Washington D.C.: Natl. Acad. Sci.-Nat. Res. Council, Publ. 1145, 1963.
- — Inhibitors and uncouplers of photophosphorylation. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **109**, 317—331 (1965).
- BAMBERGER, E. S., C. C. BLACK, CH. A. FEWSON, and M. GIBBS: Inhibitor studies on carbon dioxide fixation, adenosine triphosphate formation, and triphosphopyridine nucleotide reduction by spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* **38**, 483—487 (1963).
- BAMJI, M. S., and N. J. KRINSKY: Carotenoid de-epoxidation in algae. II. Enzymatic conversion of antheraxanthin to zeaxanthin. *J. biol. Chem.* **240**, 467—470 (1965).
- BLASS, U., J. M. ANDERSON, and M. CALVIN: Biosynthesis and possible relations among the carotenoids and between chlorophyll a and b. *Plant Physiol.* **34**, 329—333 (1959).
- BOMSEL, J. L.: An in vivo study of cyclic photophosphorylation in wheat leaves. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **262**, 1706—1709 (1966).
- BUTOW, R. A., and E. RACKER: On the mechanism of respiratory control. *J. gen. Physiol.* **49**, 149—162 (1965).
- CHOLNOKY, L., C. GYÖRGYFY, E. NAGY, and M. PÁNCZÉL: Function of carotenoids in chlorophyll-containing organs. *Nature (Lond.)* **178**, 410—411 (1956).
- DEKIEWIET, D. Y., D. O. HALL, and E. L. JENNER: Effect of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone on the photochemical reactions of isolated chloroplasts. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **109**, 284—292 (1965).
- DOROUGH, G. D., and M. CALVIN: The pathway of oxygen in photosynthesis. *J. Amer. chem. Soc.* **73**, 2362—2365 (1951).
- DUYSSENS, L. N. M., and H. E. SWEERS: Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. In: H. TAMURA, *Studies on microalgae and photosynthetic bacteria*. Tokyo: Jap. Soc. Plant Phys. 1963, p. 353—372.
- EGLER, K.: Untersuchungen über die Resistenz der Plastidenfarbstoffe. *Bot. Archiv* **45**, 93—148 (1944).

- FORK, D. C., and W. URBACH: Evidence for the localization of plastocyanin in the electron-transport chain of photosynthesis. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **53**, 1307—1315 (1965).
- GAFFRON, H.: Photosynthesis, photoreduction and dark reduction of carbon dioxide in certain algae. Biol. Rev. **19**, 1—20 (1944).
- GINGRAS, G., and C. LEMASSON: A study of the mode of action of 3-(4-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea on photosynthesis. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **109**, 67—78 (1965).
- GOULD, E. S., and J. A. BASSHAM: Inhibitor studies on the photosynthetic carbon reduction cycle in *Chlorella pyrenoidosa*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **102**, 9—19 (1965).
- HAGER, A.: Über den Einfluß klimatischer Faktoren auf den Blattfarbstoffgehalt höherer Pflanzen. Planta (Berl.) **49**, 524—560 (1957).
- Die Zusammenhänge zwischen lichtinduzierten Xanthophyll-Umwandlungen und Hill-Reaktion. Ber. dtsh. bot. Ges. **79**, 94—107 (1966).
- , u. T. MEYER-BERTENRATH: Die Isolierung und quantitative Bestimmung der Carotinoide und Chlorophylle von Blättern, Algen und isolierten Chloroplasten mit Hilfe dünnschichtchromatographischer Methoden. Planta (Berl.) **69**, 198—217 (1966).
- — Die Identifizierung der an Dünnschichten getrennten Carotinoide grüner Blätter und Algen. J. Chromatogr. (Amst.), im Druck. (1967).
- HEYTLER, P. G., and W. W. PRICHARD: A new class of uncoupling agents—carbonyl cyanide phenyl hydrazones. Biochem. biophys. Res. Commun. **7**, 272—275 (1962).
- IZAWA, S.: The swelling and shrinking of chloroplasts during electron transport in the presence of phosphorylation uncouplers. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **102**, 373—378 (1965).
- , and N. E. GOOD: The number of sites sensitive to 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, 3-(4-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea and 2-chloro-4-(2-propylamino)-6-ethylamino-s-triazine in isolated chloroplasts. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **102**, 20—38 (1965a).
- — Hill reaction rates and chloroplasts fragment size. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **109**, 372—381 (1965b).
- KATOH, S., and A. SAN PIETRO: Inhibition effect of salicylaldehyde on chloroplast photooxidation-reduction reaction. Biochem. biophys. Res. Commun. **24**, 903—908 (1966).
- KESSLER, E.: Die photosynthetische Sauerstoffentwicklung. In: Handbuch der Pflanzenphysiologie Bd. V/1, S. 923—934. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.
- Biochemische Variabilität der Photosynthese: Photoreduktion und verwandte Photosynthesetypen. In: Handbuch der Pflanzenphysiologie Bd. V/1, S. 935—965. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.
- KREINSKY, N. J.: Carotenoid de-epoxidations in algae. I. Photochemical transformation of antheraxanthin to zeaxanthin. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **88**, 487—491 (1964).
- KROGMANN, D. W., and J. J. LIGHTBODY: Plastocyanin from *Anabaena variabilis*. Plant Physiol. Proc. Ann. Meetings p. XXII (1966).
- LOSADA, M., and D. I. ARNON: Selective inhibitors of photosynthesis. In: Metabolic inhibitors, vol. II, p. 559—593. New York and London: Academic Press 1963.
- LUNDEGÄRDH, H.: The effect of light on chloroplast carotenoids. Plant Physiol. **17**, 482—491 (1964).
- Action spectra of photosynthetic activities of *Chlorella ellipsoidea*. Physiol. plantarum **19**, 541—553 (1966).

- MIFLIN, B. J., and C. P. WHITTINGHAM: The effect of inhibitors on the path of carbon in photosynthesis by *Chlorella* at low partial pressures of CO<sub>2</sub>. I. Methylamin. Ann. Bot. **30**, 329—337 (1966).
- PLENGVIDHYA, P., and R. H. BURRIS: Inhibitors of photophosphorylation and photoreduction. Plant Physiol. **40**, 997—1002 (1965).
- RUMBERG, B., P. SCHMIDT-MENDE, B. SKERRA, J. VATER, J. WEIKARD u. H. T. WITT: Analyse der Photosynthese mit Blitzlicht. III. Der Reaktionscyclus II der Photosynthese. Z. Naturforsch. **20b**, 1086—1101 (1965).
- RUPPEL, H.-G.: Untersuchungen über die Zusammensetzung von *Chlorella* bei Synchronisation im Licht-Dunkel-Wechsel. Flora (Jena) **152**, 113—138 (1962).
- SAAKOV, V. S.: The mechanism of violaxanthin during the light reaction of chloroplasts. Dokl. Akad. Nauk SSSR **148**, 1412—1415 (1963).
- Metabolism of violaxanthin <sup>14</sup>C in the leaf and its role in photosynthesis reaction. Dokl. Akad. Nauk SSSR **165**, 230—233 (1965a).
- On the possible role of xanthophylls in oxygen transfer during photosynthesis. Fiziol. Rastenij **12**, 377—385 (1965b).
- , u. J. N. KONOVALOV: Über die Funktion der Carotinoide in der Photosynthese. Trudy Botan. Sad. Akad. Nauk Kazachskoy SSSR **9**, 81—98 (1966).
- SAPOZHNIKOV, D. J., D. G. ALKHAZOV, Z. M. EIDELMAN, N. V. BAZHANOVA, J. K. LEMBERG, T. G. MASLOVA, A. B. GIRSHIN, I. A. POPOVA, V. S. SAAKOV, O. F. POPOVA, and G. A. SHRYAEVA: The assimilation of <sup>18</sup>O from heavy-oxygen water into violaxanthin when the plant is exposed to the action of light. Bot. Zhur. **46**, 673—676 (1961).
- Z. M. EIDELMAN, N. V. BAZHANOVA, and O. F. POPOVA: The inhibitory effect of hydroxylamin on the photoreactions in the course of xanthophyll transformation. Dokl. Akad. Nauk SSSR **127**, 1128—1131 (1959a).
- T. A. KRASOVSKAYA, and A. N. MAYEVSKAYA: Changes observed in the relation between the main carotenoids in the plastids of green leaves exposed to light. Dokl. Akad. Nauk SSSR **113**, 465—467 (1957).
- A. N. MAEVSKAYA, T. A. KRASOVSKAYA-ANTROPOVA, L. L. PRIALGAUSKAITE u. V. S. TURCHINA: Der Einfluß der Anaerobiose auf die Änderung des Verhältnisses der Hauptcarotinoide des grünen Blattes. Biokhimiya **24**, 34 (1959b).
- T. G. MASLOVA, N. V. BAZHANOVA, and O. F. POPOVA: Kinetics of inclusion of <sup>18</sup>O from H<sub>2</sub> <sup>18</sup>O into Violaxanthin. Biofizika **10**, 349—351 (1965).
- SHENOUE, E. A., and M. CALVIN: Isotopic oxygen incorporation in xanthophylls of *Spinacea oleracea* quantasomes. Nature (Lond.) **196**, 439—441 (1962).
- SIMONIS, W.: Photosynthese und lichtabhängige Phosphorylierung. In: W. RÜHLAND, Handbuch der Pflanzenphysiologie V/1, S. 966—1013. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.
- SIRONVAL, C., and O. KANDLER: Photooxidation processes in normal green *Chlorella* cells. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **29**, 359—368 (1958).
- SWEETSER, PH. B.: Photoinactivation of monuron, 3-(p-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea, by riboflavin 5-phosphate. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **66**, 78—85 (1963).
- TANNER, W., L. DÄCHSEL, and O. KANDLER: Effects of DCMU and antimycin A on photoassimilation of glucose in *Chlorella*. Plant Physiol. **40**, 1151—1156 (1956).
- TREBST, A.: Zur Hemmung photosynthetischer Reaktionen in isolierten Chloroplasten durch Salicylaldoxim. Z. Naturforsch. **18b**, 817—821 (1963).
- , u. H. ECK: Über eine p-Hydroxylierung in isolierten Chloroplasten. Z. Naturforsch. **18b**, 105—109 (1963).
- — u. S. WAGNER: Effects of quinons and oxygen in the electron transport system of chloroplasts. In: Photosynthetic mechanisms of green plants, p. 174—194. Washington: Nat. Acad. Sci.-Natl. Res. Council. 1963.



- WARBURG, O., u. K. JETSCHMANN: Hemmung der Phosphorylierung durch Phenanthrolin in lebender *Chlorella*. In: WARBURG, Weiterentwicklung der zellphysiologischen Methoden, S. 612—614. Stuttgart: Georg Thieme 1962.
- WHATLEY, F. R., B. M. ALLEN, and D. J. ARNON: Photosynthesis by isolated chloroplasts. VII. Vitamin K and riboflavin phosphate as cofactors of cyclic photophosphorylation. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **32**, 32—46 (1959).
- YAMAMOTO, H. Y., and C. O. CHICHESTER: Dark incorporation of oxygen into antheraxanthin by bean leaf. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **109**, 303—305 (1965).
- — and T. O. M. NAKAYAMA: Xanthophylls and the Hill reaction. *Photochem. Photobiol.* **1**, 53—57 (1962a).
- — — Biosynthetic origin of oxygen in the leaf xanthophylls. *Arch. Biochem.* **96**, 645—649 (1962b).
- T. O. M. NAKAYAMA, and C. O. CHICHESTER: Studies on the light and dark interconversions of leaf xanthophylls. *Arch. Biochem.* **97**, 168—173 (1962c).

Dozent Dr. ACHIM HAGER  
Botanisches Institut der Universität  
8 München 19, Menzinger Str. 67