

Zur Photosynthese grüner Pflanzen, VIII [1]: *in vitro*-Sauerstoffaustausch zwischen Carotinoid-Epoxiden und Wasser?

Photosynthesis of Green Plants, VIII: *in vitro* Oxygen Exchange between Carotenoid Epoxides and Water? ¹

B. Johannes und H. Budzikiewicz

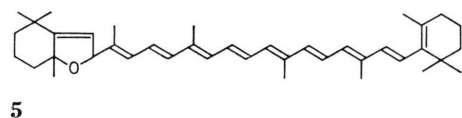
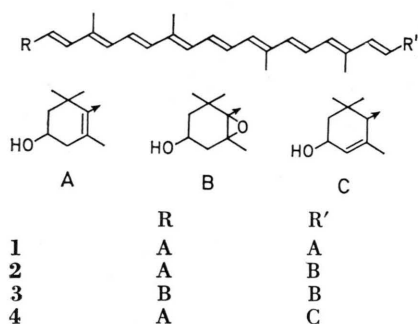
Institut für Organische Chemie der Universität Köln, Köln

Z. Naturforsch. **33 c**, 116–119 (1978); eingegangen am 12. Oktober/17. November 1977

Carotinoids, ¹⁸O Analysis, Oxygen Exchange

The *in vitro* exchange between the epoxide oxygen of carotenoids and that of water reported in literature could not be verified. Our observations rather suggest that oxidation products of the labile polyene system may invalidate ¹⁸O enrichment data obtained by indirect analysis.

Mit Ausnahme einiger niedriger Organismen besitzen alle Pflanzen in ihrem photosynthetischen Apparat eine Redoxsystem, an dem Carotinoide beteiligt sind. Einigkeit besteht heute darüber [2], daß es sich hierbei um die reversible Reaktion $\text{>C=C<} \rightleftharpoons \text{Epoxid}$ handelt, und zwar bei höheren Pflanzen in dem System Zeaxanthin (**1**) \rightleftharpoons Antheraxanthin (**2**) \rightleftharpoons Violaxanthin (**3**), das bei einigen Algen durch die acetylenischen Analoga Diatoxanthin \rightleftharpoons



Diadinoxanthin ersetzt ist [3, 4]. Kontrovers bis in die jüngste Zeit geblieben sind sowohl der genaue Mechanismus des Redoxzyklus als auch seine Bedeutung für die Pflanze:

1) Zwischenglied in der Kette der photosynthetischen Bildung von O₂ aus H₂O. Diese Idee geht zurück auf Calvin [5] (der eine Wasseranlagerung

an die β -Ionon-Doppelbindung, Oxydation des so entstandenen Alkohols zum Epoxid und enzymatische lichtinduzierte (?) Freisetzung des O₂ zur Diskussion stellt) und auf Sapozhnikov [6]. Während Calvin aufgrund späterer ¹⁸O-Markierungsexperimente von dieser Idee bald wieder abrückte [7], hielt die russische Schule bei der Deutung ihrer Versuche [8, 9] mit H₂¹⁸O daran fest, obwohl Unterschiede im Markierungsgrad von Intrazellularwasser und **3** Hilfsannahmen notwendig machten [10]. Yamamoto [11, 12] und Hager [2] konnten dann zeigen, daß der Epoxid-Sauerstoff nicht unmittelbar aus dem H₂O stammt, sondern durch Oxydation mit O₂ eingebaut wird [13], was allerdings nicht ausschließt, daß das bei der photosynthetischen Wasserspaltung gebildete O₂ erst einmal von **1** aufgenommen wird.

2) Damit ergäbe sich eine Sauerstofftransportfunktion [15] im Rahmen der Photosynthese.

3) Gleichfalls basierend auf dieser Idee nimmt Krinsky [16] an, daß im Verlaufe der Photosynthese auch Singulett-O₂ entsteht, der, würde er nicht von **1** unter Bildung von **2** und **3** aufgefangen, zu irreversiblen Zellschädigungen führte. Somit käme den Carotinoiden primär eine Schutzfunktion zu. Erfolgte die enzymatische Rückreaktion **3** \rightarrow **1** dann unter Abgabe von O₂, so liefе tatsächlich ein Teil der photosynthetischen H₂O-Spaltung über **3**.

4) Auch eine Rolle bei der photosynthetischen O₂-Aufnahme (= photosynthetische Atmung) [12, 17], u. U. in Verbindung mit dem Verbrauch überschüssiger Energie aus Photoprozessen [18], ist diskutiert worden.

5) Hager [2] konnte dann kürzlich zeigen, daß der Prozeß **3** \rightarrow **1** enzymatisch bei pH 5,2 unter gleichzeitiger Dehydrierung von Ascorbinsäure er-

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Budzikiewicz, Institut für Organische Chemie der Universität Köln, Lehrstuhl II, Greinstr. 4, D-5000 Köln 41.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

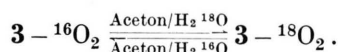
Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

folgt, der Prozeß $1 \rightarrow 3$ enzymatisch bei p_H 7,2 unter gleichzeitiger Oxidation von NADPH. Der Zyklus würde damit „Reduktionskraft“ verbrauchen und das für die Photosynthese notwendige ATP-Angebot verbessern.

Daß bei den Untersuchungen über den Redoxzyklus $1 \rightleftharpoons 3$ Markierungsversuche mit ^{18}O eine tragende Rolle gespielt haben, liegt auf der Hand, doch sind derartige Untersuchungen nicht einfach, und so ist es kaum verwunderlich, daß die Versuchsergebnisse z.T. recht widersprüchlich sind. Auf Schwierigkeiten bei der Isolierung [19] von Carotinoiden ist bereits hingewiesen worden [4, 13]. Teilweise lassen sich die Widersprüche sicher auch auf Schwierigkeiten bei der ^{18}O -Bestimmung zurückführen, die besonders bei niedrigen Anreicherungsgraden und kleinen Substanzmengen gravierend sein können [20]. Eine Problematik besonderer Art wirft jedoch eine Arbeit von Sapozhnikov [10] auf, der zufolge vollständiger Austausch zwischen dem Epoxid-Sauerstoff von Violaxanthin (3) und dem von einem $H_2^{18}O$ /Aceton-Gemisch innerhalb von 48 Stunden beobachtet wird.



Daß es sich um den Epoxid-Sauerstoff handelt, wird daraus gefolgert, daß bei Lutein (4) unter gleichen

Tab. I. Austauschversuche zwischen 3 und $H_2^{18}O$ (11,9%).

$\mu\text{mol } 3$	Austauschbedingungen		Zeit [Tage]	% $^{18}O_{\text{Viol.}}$
	Aceton [μl]	Wasser [μl]		
2,050	300	30 $H_2^{18}O$	2	0,476
2,267	300	30 $H_2^{18}O$	2	0,437
5,133	300	30 $H_2^{18}O$	2	0,431
2,823	300	30 $H_2^{18}O$	2,5	0,421
3,300	500	50 $H_2^{18}O$	2	0,421
3,133	500	50 $H_2^{18}O$	2	0,421

Tab. II. Austauschversuche zwischen 3 und $H_2^{18}O$ (11,9%) bzw. $H_2^{16}O$ (natürlich).

$\mu\text{mol } 3$	Austauschbedingungen						$\% \text{ } ^{18}\text{O}_{\text{Viol.}}$
	Hinreaktion			Rückreaktion			
	Aceton [μl]	Wasser [μl]	Zeit [Tage]	Aceton [μl]	Wasser [μl]	[Tage] Zeit	
1,900	500	50 H_2^{18}O	2	500	50 H_2^{16}O	2	0,300
2,450	500	50 H_2^{18}O	2	500	50 H_2^{16}O	2	0,413
2,417	500	50 H_2^{18}O	2	500	50 H_2^{16}O	2,5	0,366
2,920	500	50 H_2^{18}O	2	500	50 H_2^{16}O	2,5	0,338

Tab. III. Austauschversuche zwischen 4 und $H_2^{18}O$ (11,9%).

$\mu\text{mol } 4$	Austauschbedingungen		Zeit [Tage]	% $^{18}O_{\text{Lut.}}$
	[μl]	[μl]		
1,329	400 Aceton	30 $H_2^{18}O$	3	0,586
1,171	400 Aceton	30 $H_2^{18}O$	6	0,468
1,672	300 Aceton	50 $H_2^{18}O$	2	0,576
1,760	500 Aceton	50 $H_2^{18}O$	2	0,661
1,567	500 Aceton	50 $H_2^{18}O$	2	0,539

Bedingungen kein O-Isotopenaustausch beobachtet wird. Damit ist jede bei Carotinoidepoxiden beobachtete ^{18}O -Anreicherung *in vivo* bezüglich ihrer Aussagekraft mehr als zweifelhaft. Im Hinblick auf die Bedeutung der von Sapozhnikov berichteten Beobachtungen (bei der Isolierung von Carotinoiden aus Pflanzenmaterial ist Kontakt mit Wasser immer gegeben) haben wir die Experimente wiederholt und den ^{18}O -Gehalt mit Hilfe mehrerer Analysemethoden [20] untersucht. Über die Ergebnisse wird im folgenden berichtet.

Führt man Austauschversuche unter den von Sapozhnikov [10] angegebenen Bedingungen (48 Std.) mit 3 aus (11,9-prozentiges $H_2^{18}O$) und bestimmt den ^{18}O -Gehalt nach Pyrolyse zu CO_2 (s. Tab. I), so erhält man einen mittleren Gehalt von 0,433% ^{18}O , was unter Annahme, daß nur Epoxid-Sauerstoffe ausgetauscht werden, einen Markierungsgrad von 0,622% für die Positionen ergibt — ein Wert, der selbst unter Berücksichtigung der hohen Fehlergrenzen für die indirekte ^{18}O -Bestimmungsmethode [20] weit entfernt von dem für vollständige Äquilibration erwarteten (11,9%) liegt. Der Einwand, das eingesetzte $H_2^{18}O$ könnte den größten Teil seiner Markierung durch Austausch mit Aceton verloren haben (an sich nur bei Anwesenheit von Säurespuren zu erwarten [21]), kann dadurch entkräftet werden, daß Behandlung mit $H_2^{18}O$ /Aceton (48 Std.) und anschließend mit $H_2^{16}O$ /Aceton (48 Std.) — was zu einem vollständigen Verlust der

Tab. IV. Austauschversuche zwischen **4** und H_2^{18}O (11,9%) bzw. H_2^{16}O (natürlich).

$\mu\text{mol } 4$	Austauschbedingungen						% $^{18}\text{O}_{\text{Lut.}}$
	Hinreaktion			Rückreaktion			
	$[\mu\text{l}]$	$[\mu\text{l}]$	Zeit [Tage]	$[\mu\text{l}]$	$[\mu\text{l}]$	Zeit [Tage]	
1,104	400 Aceton	30 H_2^{16}O	2	400 Aceton	30 H_2^{18}O	2	0,474
1,620	500 Aceton	30 H_2^{16}O	2	500 Aceton	30 H_2^{18}O	2	0,512
1,215	400 Aceton	40 H_2^{18}O	3	400 Aceton	40 H_2^{16}O	2	0,466
1,180	400 Aceton	30 H_2^{18}O	2	400 Aceton	30 H_2^{16}O	2	0,580

Tab. V. Austauschversuche zwischen **3** und H_2^{18}O bzw. markiertem **5** und H_2^{16}O (Mittelwerte aus jeweils 4 Messungen).

Austauschbedingungen	% ^{18}O	
	vor dem Austausch	nach dem Austausch
500 μl Aceton + 30 μl H_2O (natürlich) + 1 mg markiertes 5	10,5	10,8
200 μl Aceton + 10 μl H_2^{18}O (95%) + 1 mg 3	0,204	0,192

Markierung in **3** führen müßte — einen Endgehalt von 0,354% ^{18}O liefert, der sich signifikant von dem natürlichen Gehalt (0,204%) unterscheidet. Im Gegensatz zu den Angaben von Sapozhnikov [10] fanden wir auch bei **4**, das keine Epoxidgruppen enthält, nach analoger Behandlung (H_2^{18}O gefolgt von H_2^{16}O) etwa dieselbe Einbaurate von ^{18}O wie bei **3** (s. Tabn. II und IV). Eine geringe ^{18}O -Anreicherung bei Behandlung von **3** (0,234%) bzw. **4** (0,229%) mit Aceton/ H_2^{18}O ließ sich auch bei Bestimmung des ^{18}O -Gehaltes durch Protonenaktivierung feststellen. Dagegen konnte bei einer für die epoxierten Ringe spezifischen ^{18}O -Analyse mit Hilfe einer massenspektroskopischen Messung [20] unter Hochauflösung (Verhältnis der Peakintensitäten m/e 223 : 221 für **3** bzw. m/e 207 : 205 für β -Carotin-5,8-epoxid, **5**) sowohl bei Behandlung von **3** mit H_2^{18}O (95%) als auch von ^{18}O -markiertem **5** [22] mit natürlichem H_2O im Bereich der Meßgenauigkeit keine Veränderung des Anreicherungsgrades beobachtet werden (s. Tab. V).

Aus den letztangeführten Messungen folgt, daß in Aceton/Wasser-Lösung keinerlei Austausch zwischen dem Sauerstoff des Wassers und dem Epoxid-Sauerstoff von Carotinoiden erfolgt. Die auf indirektem Wege (Analyse von pyrolytisch erhaltenem CO_2) bzw. durch Protonenaktivierungsmessungen festgestellten erhöhten ^{18}O -Gehalte müssen — abgesehen von der bei der indirekten Methode leicht möglichen Verfälschung der Absolutwerte [20] — daher anders erklärt werden. Sie sind darin zu suchen, daß beide Methoden den globalen Sauerstoffgehalt einer Probe einschließlich vorhandener Verunreinigungen erfassen und damit auf mitgeschleppte Spuren von H_2^{18}O sowie die infolge der hohen Reaktivität des Polyensystems leicht entstehende Oxydations- und Additionsprodukte der Carotinoide ansprechen. Für die Bedeutung der letzteren sprechen die Ergebnisse mit **4** sowie insbesondere die Rückaustauschversuche.

Ergebnis: 1) Ein Austausch zwischen Epoxid-Sauerstoff und H_2O braucht bei Carotinoiden nicht in Betracht gezogen zu werden.

2) Die a.a.o. [20] diskutierte Problematik der ^{18}O -Analyse bei geringen Mengen labiler Verbindungen wird hier nochmals unterstrichen.

Herrn Prof. Dr. K. Wirtz und Herrn Dr. D. Staschewski, Kernforschungszentrum Karlsruhe, möchten wir für die Überlassung von H_2^{18}O , den Herren Dres. H. Weigel und M. Heimann, Institut für Kernchemie, Köln, für die Protonenaktivierungsanalysen und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Massenspektrometer GD 150 und MAT 731 bestens danken.

[1] VII. Mitteilung: s. Ref. [20].

[2] A. Hager, Ber. Dtsch. Bot. Ges. **88**, 27 (1975).[3] B. Johannes, H. Brzezinka u. H. Budzikiewicz, Z. Naturforsch. **26b**, 377 (1971).

[4] Es sind auch andere Systeme diskutiert und z. T. durch Markierungsversuche gestützt worden, z. B. Bildung von Lutein im Reduktionsverlauf [15] oder von Neoxanthin in der Oxydationskette [V. S. Saakov, Dokl.

- Akad. Nauk SSSR **155**, 1212 (1964)]. Trennprobleme [5, 8] sowie Einbau von Markierung auf anderen Wegen (vgl. Ref. [10]), z. B. über den allgemeinen Stoffwechsel-Pool könnten den Grund für Fehlidentifizierungen (vgl. Ref. [2], p. 31, sowie Ref. [14]) sein.
- [5] G. D. Dorough u. M. Calvin, J. Amer. Chem. Soc. **73**, 2362 (1951).
- [6] D. I. Sapozhnikov u. A. B. Lopatkin, Dokl. Akad. Nauk SSSR **72**, 413 (1950).
- [7] E. A. Shneour u. M. Calvin, Nature **196**, 439 (1962).
- [8] D. I. Sapozhnikov, D. G. Alkhazov, Z. M. Eydelman, N. V. Bazhanova, I. Kh. Lemberg, T. G. Maslova, A. B. Girshin, I. A. Popova, V. S. Saakov, O. F. Popova u. G. A. Shiryayeva, Dokl. Akad. Nauk SSSR **154**, 974 (1964).
- [9] D. I. Sapozhnikov, T. G. Maslova, N. V. Bazhanova u. O. F. Popova, Biofizika **10**, 349 (1965).
- [10] D. I. Sapozhnikov, V. M. Kuturur, T. G. Maslova, M. V. Ulubekova, N. M. Kuturur, T. G. Maslova u. K. G. Semyenyuk, Dokl. Akad. Nauk SSSR **175**, 1182 (1967).
- [11] H. Y. Yamamoto u. C. O. Chichester, Biochim. Biophys. Acta **109**, 303 (1965).
- [12] C. A. Takeguchi u. H. Y. Yamamoto, Biochim. Biophys. Acta **153**, 459 (1968).
- [13] Wie der von Sapozhnikov [8] beobachtete Einbau von ^{18}O in **3** zu erklären ist, scheint immer noch offen zu sein. Als Möglichkeiten wurden diskutiert:
1. Die photosynthetische O_2 -Entwicklung läuft tatsächlich partiell über $\mathbf{1} \rightarrow \mathbf{3} \rightarrow \mathbf{1}$.
 2. Von der Photosynthese unabhängiger Metabolismus der Carotinoide unter Einbeziehung des Intrazellulärwassers (Einbau von ^{18}O in die Hydroxyl- wie auch in die Epoxidgruppen) [10].
 3. Oxydation mittels aus H_2^{18}O photosynthetisch gebildetem $^{18}\text{O}_2$ bei dem Prozeß $\mathbf{1} \rightarrow \mathbf{3}$ [12] (vgl. auch Ref. [16]).
 4. Austausch $\mathbf{3} - ^{18}\text{O}_2 + \text{H}_2^{18}\text{O} \rightleftharpoons \mathbf{3} - ^{18}\text{O}_2 + \text{H}_2^{16}\text{O}$; hierauf wird weiter unten eingegangen, und
 5. es handelt sich um mitgeschleppte markierte Verunreinigungen, wofür die Experimente von Calvin [7], Yamamoto [12] und insbes. von Saakhov [14] sprechen, der jeweils gleiche ^{18}O -Einbauraten im Licht- und im Dunkelversuch sowohl bei **2** (lies jedoch Diadinoxanthin) als auch bei **1** (lies: Diatoxanthin) — also offensichtlich OH-Austausch (?) — beobachtete.
- [14] V. V. Saachov, I. Kh. Lemberg, G. D. Nazarova, A. B. Girschkin, G. M. Gusinskii u. E. V. Mylnikova, Dokl. Akad. Nauk SSSR **193**, 713 (1970); statt **2** und **1** muß es allerdings Diadinoxanthin und Diatoxanthin heißen [A. Hager u. H. Stransky, Arch. Mikrobiol. **73**, 77 (1970); K. Aitzetmüller, W. A. Svec, J. J. Katz u. H. H. Strain, Chem. Comm. **32** (1968) sowie Ref. [3]].
- [15] L. Cholnoky, C. Györgyfy, E. Nagy u. M. Panczel, Nature **178**, 410 (1956).
- [16] N. I. Krinsky, Carotenoids (O. Isler, Hrsg.), p. 669 ff., Birkhäuser Verlag, Basel 1971.
- [17] H. Y. Yamamoto, J. L. Chang u. M. S. Aihara, Biochim. Biophys. Acta **141**, 342 (1967).
- [18] K. H. Lee u. H. Y. Yamamoto, Phytochem. Phytobiol. **7**, 101 (1968).
- [19] Die Gefahr eines Isotopenaustausches während der chromatographischen Reinigung ist nach früheren Untersuchungen bei Verwendung von Kieselgel unwahrscheinlich [D. Samuel u. I. Wasserman, Anal. Biochem. **9**, 246 (1964)], bei Aluminiumoxid jedoch in Betracht zu ziehen [D. Samuel u. I. Wasserman, Chem. Ind. 891 (1964)]. Einige Versuche (B. Johannes, Dissertation TU Braunschweig, 1971) haben gezeigt, daß selbst mehrfache Chromatographie von β -Carotin-5,8-epoxid sowohl auf Kieselgel H-Ca(OH) $_2$ als auch auf Al_2O_3 (basisch)-Platten zu keinerlei Markierungsverlust führte.
- [20] Über die verschiedenen zur Verfügung stehenden Methoden, deren Problematik und Grenzen wird a.a.O. (Fresenius Z. Anal. Chem., im Druck) berichtet.
- [21] M. Cohn u. H. C. Urey, J. Amer. Chem. Soc. **60**, 679 (1938); G. Aksnes, D. Aksnes u. P. Albriktsen, Acta Chem. Scand. **20**, 1325 (1966); M. Byrn u. M. Calvin, J. Amer. Chem. Soc. **88**, 1916 (1966).
- [22] Die Darstellung ist in Ref. [20] beschrieben.