Über den Zerfall von Ribulose und Ribulosediphosphat bei der Papierchromatographie

Von H. KAUSS und O. KANDLER

Aus dem Institut für Angewandte Botanik der TH München

(Z. Naturforschg. **19 b**, 439—441 [1964]; eingegangen am 18. Februar 1964)

Radioactive ribulose splits spontaneously on paper chromatograms to give glyceric acid, erythronic acid and glycolic acid. Ribulosediphosphate yields phosphoglyceric acid, phosphoerythronic acid and phosphoglycolic acid on the paper. Within 2 months more than 50% is split.

Werden die radioaktiven Zuckerdiphosphate aus Photosynthese-Versuchen mit $^{14}CO_2$ dephosphoryliert, dann können die dadurch erhaltenen freien Zucker durch zweidimensionale Papierchromatographie vollkommen voneinander getrennt werden. Wenn man einen so erhaltenen sauber abgetrennten Fleck von Ribulose nach einiger Zeit erneut in den gleichen Lösungsmitteln chromatographiert, so ergibt sich neben einem Ribulosefleck eine größere Anzahl von neuen radioaktiven Flecken (Abb. 1). Die entsprechenden Substanzen können ursprünglich nicht in dem Ribulosefleck enthalten gewesen sein, da ihre R_f-Werte wesentlich anders sind als die von Ribulose. Man muß daher annehmen, daß die neuen Substanzen durch Zerfall der Ribulose auf dem Papier entstanden sind.

Durch Papierelektrophorese bei p_H 5,6 und 9,5 und durch Cochromatographie in 6 verschiedenen Lösungsmitteln konnten die stärker radioaktiven Flecken als Glycerinsäure, D-Erythronsäure und Glykolsäure identifiziert werden. Der Fleck 6 (Abb. 1) ist keine Ribulose. Beim Kochen in alkalischer Lösung zerfällt er ähnlich wie die Ribulose in Erythronsäure, Glycerinsäure und Glykolsäure. Es dürfte sich um eine durch Isomerisation aus der Ribulose entstandene andere Pentose handeln.

Wird die Ribulose 5 Wochen nach der erstmaligen Chromatographie rechromatographiert, so liegen nur 20 – 30% der Radioaktivität als Zerfallsprodukte vor, während nach einer Lagerzeit von 18 Monaten 60 – 80% der Radioaktivität auf den Chromatogrammen als Bruchstücke vorliegen (Tab. 1). Der Zerfall ist also eindeutig zeitabhängig.

Da die Bruchstücke fast ausschließlich Säuren sind, muß man für den Zerfall einen oxydativen Mechanismus annehmen. Das Auftreten von Spaltstücken mit 2, 3 und 4 Kohlenstoffatomen deutet darauf hin, daß das Ribulosemolekül an mindestens 2 Stellen zer-

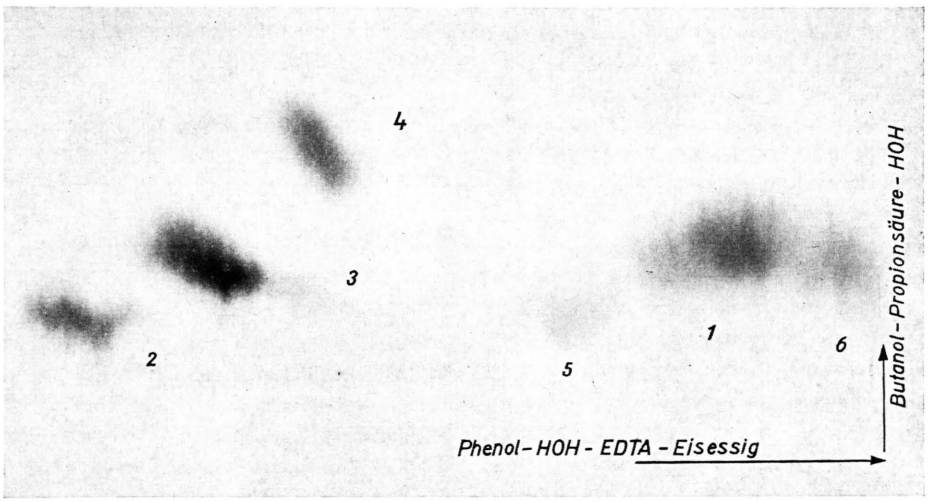

Abb. 1. Zerfallsprodukte der Ribulose. Rechromatogramm eines Ribulosefleckes nach 18 Monaten Lagerzeit (entsprechend dem Versuch in Spalte 2 von Tab. 1). 1 Ribulose, 2 Erythronsäure, 3 Glycerinsäure, 4 Glycolsäure, 5 Erthronsäure-γ-Lacton, 6 nicht identifiziert (wahrscheinlich eine Pentose). Der Startpunkt liegt 4 cm links außerhalb des Bildes.

bricht. Eine Spaltung zwischen Atom 1 und 2 dürfte zu Erythronsäure und einem flüchtigen C-1-Körper führen, während ein Bruch zwischen Atom 2 und 3 Glycerinsäure und Glykolsäure ergeben wird. Zur oxydativen Spaltung an diesen beiden Stellen muß eine Enolisierung zwischen C 1 und C 2 und zwischen C 2 und C 3 vorausgesetzt werden. Daß diese beiden Enolisierungen zumindest bei Ribulosediphosphat in wäßriger Lösung auftreten, ist aus Versuchen mit D_2O bzw. tritiummarkiertem Wasser bekannt[1,2]. Auf unseren Chromatogrammen (Tab. 1) war der prozentuale Anteil der Glycerinsäure an der Radioaktivität immer ungefähr doppelt so hoch wie der Anteil der Erythronsäure, die Bruchwahrscheinlichkeit zwischen Atom 2 und 3 muß also deutlich größer sein als zwischen Atom 1 und 2.

Lagerzeit	5 Wochen	18 Monate
Ribulose	74,9	30,1
Glycerinsäure	9,0	32,3
Erythronsäure + Lacton	4,0	18,3
Glykolsäure	3,6	15,2
Pentose ?	8,5	4,1

Tab. 1. Einfluß der Lagerzeit auf die Zerfallsrate von Ribulose. Prozentuale Verteilung der Radioaktivität eines 5 bzw. 18 Monate bei Raumtemperatur gelagerten Fleckes von Ribulose nach erneuter Chromatographie. Die Ribulose des Versuchs mit 5 Wochen Lagerzeit stammte aus den Diphosphatestern von *Anacystis nidulans* (4 min PS in $^{14}CO_2$ bei 30 °C), die Ribulose des Versuchs mit 18 Monaten Lagerzeit aus den Zuckerdiphosphaten von *Chlorella pyrenoidosa* (5 min PS in $^{14}CO_2$ bei 26 °C).

Über die Ursache für den Zerfall auf den Chromatogrammen kann man nur Vermutungen anstellen. Ribulose und Ribulosediphosphat sind in alkalischem Medium instabil[3,4]. Da aber wäßrige Extrakte aus unseren Papierchromatogrammen einen p_H-Wert von 4,5 – 5,5 haben, kann der Zerfall nicht durch alkalische Oxydation verursacht sein. In Frage käme auch noch eine Selbstzerstrahlung, wie sie bei gefrier-trockenen hochaktiven organischen Substanzen auftritt[5]. Letzteres erscheint aus folgendem Grund unwahrscheinlich: nach 5 min Photosynthese mit $^{14}CO_2$ haben die Hexosen aus den Phosphatestern sicher ähnliche spez. Aktivitäten wie die Pentosen. Auf Chromatogrammen, auf denen die Ribulose z. B. zu 74% zerfallen ist, liegt aber die Fructose zu höchstens 3% und die Glucose zu höchstens 1% in Form von Bruchstücken vor. Im Falle einer Selbstzerstrahlung sollten auch diese Zucker ähnliche Zerfallsraten wie die Ribulose aufweisen. Der Zerfall der Ribulose liegt wohl in der Baueigentümlichkeit des Ribulosemoleküls begründet. Dabei dürfte die Ausbreitung der geringen Substanzmenge auf der großen Oberfläche der Papierfasern den Vorgang beschleunigen. Die Instabilität hängt sicherlich eng mit der „Eignung" des Ribulosediphosphats als CO_2-Acceptor bei der Photosynthese zusammen.

Der Befund, daß die Ribulose auf den Papierchromatogrammen zu den beschriebenen Bruchstükken zerfällt, erlaubt auch eine zwanglose Erklärung folgender Beobachtung. Nach dem Dephosphorylieren der Zuckerdiphosphate aus Photosynthese-Produkten findet man außer Ribulose und den Hexosen stets auch etwas Glycerinsäure und Flecken mit den R_f-Werten von Erythronsäure und Glykolsäure. Wir konnten zeigen, daß sich durch Rechromatographie des Diphosphatfleckes einige neue Monophosphatester-Flecke abtrennen lassen, die nach dem Dephosphorylieren Glycerinsäure, Glykolsäure und Erythronsäure ergeben. Diese Verbindungen lagen also im ursprünglichen Diphosphatfleck als Monophosphate vor. Offensichtlich zerfällt also das Ribulosediphosphat auf den Chromatogrammen in ganz ähnlicher Weise wie die freie Ribulose, wobei Phosphoglycerinsäure, Phosphoerythronsäure und Phosphoglykolsäure entstehen. Bisher hatte man zur Erklärung des Vorkommens von Phosphoglycerinsäure in den Diphosphaten angenommen, daß eventuell kleine Mengen der bei der Reduktion der 3-Phosphoglycerinsäure intermediär entstehenden 1-3-Diphosphoglycerinsäure die Extraktion überstehen könnten. Diese Annahme war allerdings stets unbefriedigend, da die 1-3-Diphosphoglycerinsäure sehr labil ist.

Der spontane Zerfall des Ribulosediphosphats auf den Chromatogrammen läßt weiterhin vermuten, daß diese Substanz auch bei der Extraktion der Algen und bei der Aufarbeitung der Extrakte zum Teil zerfällt. Die auf den Chromatogrammen vorliegende radioaktive 3-Phosphoglycerinsäure würde dann nur zum Teil aus der Carboxylierung des Ribulose-

[1] H. D. Dorrer, Dissertation THM 1964; Herrn Dr. H. Simon vom Inst. f. organ. Chemie TH München danken wir für diese persönliche Mitteilung und für wertvolle Diskussionsbeiträge.

[2] J. Hurwitz, W. B. Jacoby u. B. L. Horecker, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **22**, 194 [1956].

[3] S. S. Cohen, J. biol. Chemistry **201**, 71 [1953].

[4] A. A. Benson, J. A. Bassham, M. Calvin u. Mitarbeiter, J. biol. Chemistry **196**, 703 [1952].

[5] E. J. Bourne, D. H. Hutson u. H. Weigel, J. chem. Soc. [London] **1960**, 5153.

diphosphats stammen, während ein – wahrscheinlich relativ kleiner – Teil als Artefakt durch den Zerfall des Ribulosediphosphats entsteht. Für einen solchen Zerfall des Ribulosediphosphats bei der Aufarbeitung der Zellextrakte spricht auch das Vorkommen von Erythronsäurephosphat auf den Chromatogrammen der Photosynthese-Produkte. Bisher hatte man die nicht sehr wahrscheinliche Annahme gemacht, daß diese Substanz durch Oxydation von Erythrose-4-phosphat gebildet wird [6].

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Sachbeihilfe.

[6] V. Moses u. M. Calvin, Arch. Biochem. Biophysics **78**, 598 [1958].

Strukturuntersuchungen an Plastiden

VI. Über die Struktur der Lipoproteinlamellen in Chloroplasten lebender Zellen

Von Werner Kreutz *

Aus dem Botanischen Institut der Universität Köln

(Z. Naturforschg. **19 b**, 441—446 [1964]; eingegangen am 14. November 1963)

Aus lichtmikroskopischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen ist ersichtlich, daß in Plastiden gelber Blätter einer Plastommutante von *Antirrhinum majus* Sippe 50 viel weniger Lamellen und Lamellenstapel ausgebildet sind als in Plastiden grüner Blätter der normalen Pflanze. Setzt man voraus, daß sich die beiden Blattypen nur in diesem Strukturmerkmal wesentlich unterscheiden, so kann die Röntgen-Kleinwinkelstreuung der Lipoproteinlamellen und deren Stapelung erhalten werden, wenn von der Röntgen-Kleinwinkelstreuung grüner Blätter der normalen Pflanze die Röntgen-Kleinwinkelstreuung gelber Blätter der Mutante subtrahiert wird.

Die Analyse der Differenzstreuung zeigt, daß in jeder der beiden Lipidschichten eines Thylakoids zwei verschiedene Dichtezonen existieren, eine mit höherer und eine mit niedrigerer Elektronendichte als die des Wassers. Die beiden Lipidschichten sind im Thylakoidinnern so angeordnet, daß die Zonen höherer Elektronendichte benachbart verlaufen. Die Zone mit höherer Elektronendichte wird auf Grund einer Dichteabschätzung als eine Anhäufung aliphatischer Ketten interpretiert. Die Zone niedrigerer Elektronendichte wird als Ort der Porphyrinringe des Chlorophylls und sonstiger sperriger Molekülteile angesehen. Der Raum zwischen den beiden Lipidschichten wird durch eine 15—20 Å breite Wasserschicht eingenommen. Die aliphatische Zone ist wasserfrei. Die Porphyrinringzone enthält etwa 30% Wasser.

Für die Proteinschichten, die die äußere Begrenzung des Thylakoids bilden, kann eine Schichtdicke von 34—37 Å angegeben werden. Innerhalb der Proteinschichten existieren Kristallite aus Proteinpartikeln in zweidimensionaler Gitteranordnung. Der Mittelpunktsabstand zweier benachbarter Partikel beträgt etwa 32 Angström.

Für die mittlere Periode der Thylakoidstapelung ergibt sich ein Wert von 250 Angström.

Die Elektronendichte-Verteilung längs der Flächennormalen im Thylakoid lufttrockener Chloroplasten, die aus der Fourier-Umkehr der Röntgen-Kleinwinkeldiagramme in Mitt. V [1] erhalten wurde, zeigte, daß im Innern des Thylakoids zwei Lipidschichten benachbart verlaufen und daß jede Lipidschicht aus zwei Zonen verschieden hoher Elektronendichte besteht. Eine Vorstellung über die Verteilung der Lipidkomponenten in den beiden Lipidschichtzonen ergab sich auf Grund einer Dichteabschätzung. Danach hat man sich die Lipidschichtzone mit hoher Elektronendichte aus aliphatischen Ketten in dichter Packung aufgebaut zu denken. Für die Zone niedriger Elektronendichte muß eine Anhäufung sperriger Molekülteile angenommen werden.

Bei der Auswertung der Röntgen-Kleinwinkeldiagramme wasserhaltiger isolierter Chloroplasten und lebender Chlorellazellen in Mitt. III [2] wurde die Lipidschicht als kompakte Platte mit gleichmäßiger Elektronendichte-Verteilung angesehen. Dieses Vorgehen entsprach dem Genauigkeitsgrad der Untersuchung, denn die Streukurvenanalyse war durch Hilfsannahmen bzw. durch experimentelle Unsicherheiten eingeschränkt. Die näherungsweise Eliminierung der Streuung der Restzelle bei Algenaufnahmen führte im Innenteil der Streukurve zu wesentlichen Intensitätsfehlern. Bei den Aufnahmen wäßriger Chloroplasten wurden sehr wahrscheinlich wegen

* Neue Anschrift: Max-Volmer-Institut für physikalische Chemie, Technische Universität Berlin. Hier erfolgte die Auswertung der in Köln durchgeführten Experimente.

[1] W. Kreutz, Z. Naturforschg. **18 b**, 1098 [1963].
[2] W. Kreutz, Z. Naturforschg. **17 b**, 675 [1962].