©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

Neue Aspekte der Chlorophyll-Biosynthese

Von Univ.-Prof. Dr. Wolfhart Rüdiger,
München

Vortrag, gehalten am 25. April 1979

Das Blattgrün (Chlorophyll) ist der Farbstoff, der dem Menschen in seiner natürlichen Umwelt am häufigsten begegnet. Bekannt ist die Bedeutung des Blattgrüns für die Photosynthese, d. h. die Nutzbarmachung der Sonnenenergie zum Aufbau von organischen Kohlenstoff-Verbindungen aus anorganischem Kohlendioxid der Luft. An der eigentlichen photochemischen Reaktion ist aber nur ein verschwindend kleiner Bruchteil des gesamten Blattgrüns beteiligt: Das Chlorophyll der Reaktionszentren macht weniger als 1% des gesamten Chlorophylls aus. Der überwiegende Teil des Pigments (d. h. praktisch alles war wir sehen!) dient nur als „Antennen- und Lichtsammler-Pigment": Die von diesem Pigment-Anteil absorbierte Lichtenergie wird an die Reaktionszentren weitergeleitet.

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

Diese unterschiedlichen Funktionen gehen auf unterschiedliche Proteine zurück, an die das Blattgrün gebunden ist. Die chemische Struktur des Pigments selbst ist dagegen invariabel: Das Reaktionszentrum enthält nur Chlorophyll a, die Antennen- und Lichtsammler-Komplexe neben Chlorophyll a bei höheren Pflanzen noch Chlorophyll b (Strukturen in Abb. 1). Bei einigen Algen ist Chlorophyll b durch andere Pigmente ersetzt, jedoch behält auch dort das Chlorophyll a seine dominierende Rolle. Da Chlorophyll b sich biogenetisch vermutlich von Chlorphyll a ableitet,

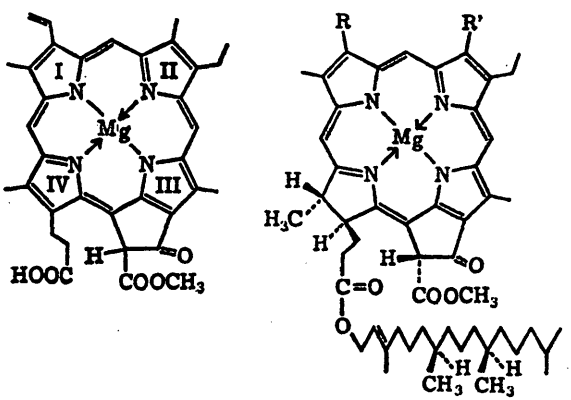

Abb. 1: Chemische Strukturen von Chlorophyllen
links: Protochlorophyllid (freie Carbonsäure)
rechts: die Phytylester Chlorophyll **a** mit R = Vinyl, R' = CH_3 bzw. Chlorophyll **b** mit R = Vinyl, R' = CHO. Die freien Carbonsäuren heißen Chlorophyllid **a** bzw. **b**.

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

soll hier nur auf die Biosynthese des letzteren eingegangen werden.

Die Biosynthese von Chlorophyll a ist bei den meisten höheren Pflanzen lichtabhängig. Im Dunkeln wird die biogenetische Vorstufe Protochlorophyllid (Struktur in Abb. 1) akkumuliert. Die Menge dieses Pigments ist aber so gering, daß die Pflanzen bleich bzw. aufgrund des Carotinoid-Gehalts gelb aussehen. Protochlorophyllid wird durch Licht photochemisch in Chlorophyllid a umgewandelt, welches dann verestert wird (Abb. 2). Aufgrund der photochemischen Reaktion werden größere Mengen an Chlorophyll erst im Dauerlicht akkumuliert.

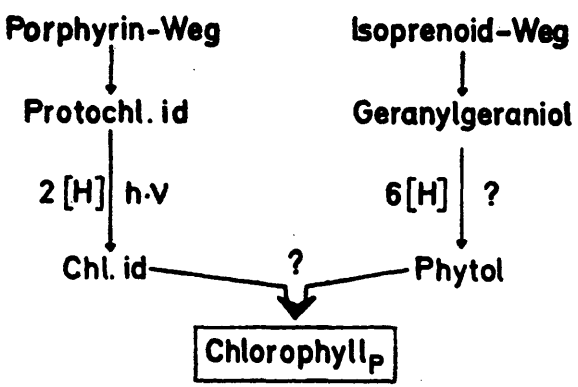

Abb. 2: Schema der vermuteten Chlorophyll-Biosynthese. Die Fragezeichen stehen für die jetzt näher untersuchten Schritte.

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

Wir haben uns seit einiger Zeit mit der Veresterungsreaktion beschäftigt, da sie in ihrem Ablauf noch nicht restlos geklärt worden war (BOGORAD 1976). So nahmen die meisten Autoren eine durch das Enzym Chlorophyllase katalysierte Veresterung mit freiem Phytol an (ELLSWORTH 1971, 1972; CHIBA et al. 1967; WELLBURN 1970). Das erscheint merkwürdig, da die Chlorophyllase mit Sicherheit die Hydrolyse von Chlorophyll zu Chlorophyllid und Phytol katalysiert; Abbau und Biosynthese werden in der Zelle normalerweise aber von verschiedenen Enzymen katalysiert. Für die Synthese-Reaktion in vitro benötigt die Chlorophyllase einen großen Überschuß an freiem Phytol, der aber in ergrünenden Blättern erst noch nachgewiesen werden müßte. Die Isoprenoid-Biosynthese sollte als erstes C_{20}-Produkt Geranylgeranylpyrophosphat liefern, das dann erst durch schrittweise Hydrierung in Phytol übergehen sollte (Abb. 3; die Stellung der Doppelbindungen in den Zwischenprodukten ist zunächst willkürlich). Diese Hydrierung könnte möglicherweise auf der Stufe der Pyrophosphorsäure-Ester stattfinden, da kleine Mengen an Phytylpyrophosphat in Blättern nachgewiesen wurden (WATTS und KEKWICK 1974), jedoch sind weder Geranylgeranylpyrophosphat noch Phytylpyrophosphat Substrate für die Chlorophyllase (WELLBURN 1970).

Abgesehen von diesen Unklarheiten verdient

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

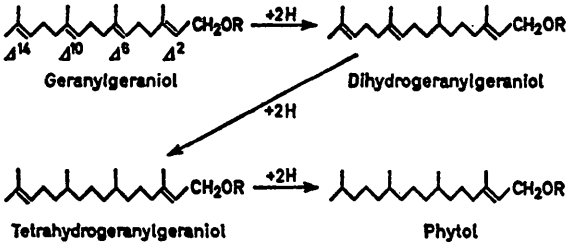

Abb. 3: Chemische Struktur von Phytol und dessen Vorstufen. Die Stellung der Doppelbindungen war zunächst willkürlich, sie wurde erst im Verlauf unserer Arbeiten im Sinne der angegebenen Strukturen festgelegt (s. unten).

die Veresterungsreaktion Interesse, da sie 2 verschiedene Stoffwechselwege (den Porphyrin-Weg und den Isoprenoid-Weg) miteinander verknüpft. Es erhebt sich daher die Frage, ob und, wenn ja, wie diese Stoffwechselwege bei der Chlorophyll-Biosynthese kooperieren.

Wir haben uns zunächst mit der Frage beschäftigt, wie der Phytolgehalt sich in Pflanzen, die im Dunkeln gekeimt waren, während der nachfolgenden Chlorophyllakkumulation im Licht ändert. Wir fanden in den Dunkelpflanzen kein freies Phytol, jedoch bereits in den Körnern (Karyopsen) von Weizen, Hafer und Gerste verestertes Phytol, dessen Menge jedoch bei der Dunkelkeimung abnahm (STEFFENS et al. 1976). Dieses Phytol könnte aus dem Abbau von Chlorophyll während des Reifens der Körner stam-

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

men, scheint aber mit der Chlorophyll-Biosynthese der Keimlinge nichts zu tun zu haben. Während der nachfolgenden Chlorophyllakkumulation im Dauerweißlicht wird auch Phytol akkumuliert, und zwar signifikant mehr als nach dem Chlorophyllgehalt zu erwarten ist (Abb. 4). Auch bei diesem Phytolüberschuß handelt es sich nicht um freies, sondern um gebundenes Phytol, das erst durch alkalische Hydrolyse freigesetzt wird. Nach dem Wirkungsspektrum ist diese Phytolakkumulation mit der Chlorophyll-Biosynthese eng gekoppelt; mit einsetzender Dunkelheit wird nicht nur die Chlorophyll-, sondern auch die Phytolakkumulation eingestellt (STEFFENS et al. 1976).

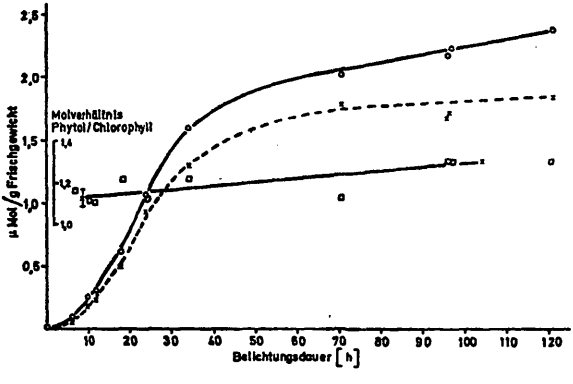

Abb. 4: Akkumulation von Chlorophyll und Gesamt-Phytol in etiolierten Weizenkeimlingen bei Dauerbelichtung mit Weißlicht. x--x--x Chlorophyll, o-o-o Gesamt-Phytol, □-□- Molverhältnis Phytol/Chlorophyll (nach STEFFENS et al. 1976).

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

Der Phytolüberschuß könnte aus dem Chlorophyll-Abbau resultieren, da das Phytol eine längere Lebensdauer hat als der Chlorophyllid-Rest (STEFFENS et al. 1976).

Die Ergebnisse weisen auf einen engen Zusammenhang zwischen der Photokonversion Protochlorophyllid ⟶ Chlorophyllid und der Phytolakkumulation hin, also auf eine Koordination von Porphyrin- und Isoprenoid-Stoffwechsel. Um diese Koordination aufzuheben, haben wir Hemmstoffe für jeden der beiden Stoffwechselwege angewendet. Lävulinsäure, die bekanntlich den Porphyrin-Stoffwechsel spezifisch hemmt, führt zu einer streng parallelen Hemmung von Chlorophyllid- und Phytol-Biosynthese bzw. -Akkumulation (STEFFENS 1975). Da eine direkte Einwirkung von Lävulinsäure auf den Isoprenoid-Stoffwechsel unwahrscheinlich ist, muß man schließen, daß Phytol nicht unabhängig von Chlorophyllid akkumuliert werden kann. Da keine spezifischen Hemmstoffe für die Phytol-Biosynthese bekannt waren, haben wir solche Stoffe verwendet, für die eine Hemmwirkung auf die Carotinoid-Biosynthese beschrieben worden war (RÜDIGER et al. 1976, RÜDIGER und BENZ 1979). Von diesen führte das 3-Amino-1,2,4-triazol zu einer Hemmung der Phytolakkumulation über das Maß der Chlorophyllakkumulation hinaus. Eine Analyse der Pigmentfraktion ergab, daß das Chlorophyll z. T. mit Geranylgeraniol und Di-

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

hydrogeranylgeraniol, also vermuteten Phytol-Vorstufen (s. Abb. 3), verestert war.

Wenn diese Ergebnisse auch die Möglichkeit aufzeigten, daß das Chlorophyllid zunächst mit Phytol-Vorstufen verestert werden könnte, die dann erst am Pigment zum Phytol hydriert werden, so ergab sich doch der Einwand, daß das möglicherweise nur auf die toxische Wirkung des Hemmstoffs zurückzuführen sein könnte und mit der eigentlichene Biosynthese nichts zu tun hätte. Es galt also zu prüfen, ob unter physiologischen Bedingungen auch pigmentgebundene Phytol-Vorstufen aufzufinden sind.

Für diese Versuche wurden zunächst im Dunkeln gewachsene Haferkeimlinge verwendet, die Protochlorophyllid akkumuliert hatten (Abb. 5). Kleine Mengen (ca. 5% bezogen auf Protochlorophyllid) an verestertem Protochlorophyll blieben bei den nachfolgenden Versuchen unverändert und wurden daher nicht weiter untersucht. Durch eine kurze Lichteinwirkung wurde das Protochlorophyllid in Chlorophyllid a umgewandelt, die Keimlinge kamen dann sofort ins Dunkle zurück. Die Veresterung des Chlorophyllids setzte sofort ein, sie war nach ca. 60 Minuten beendet. Die Gesamtmenge an Chlorophyll + Chlorophyllid blieb während dieser Zeit konstant, dagegen wurde Protochlorophyllid (unverestert!) nach einer lag-Phase wieder akkumuliert. Der Pigmentgehalt war bei diesen Versuchen 100—1000 mal niedri-

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

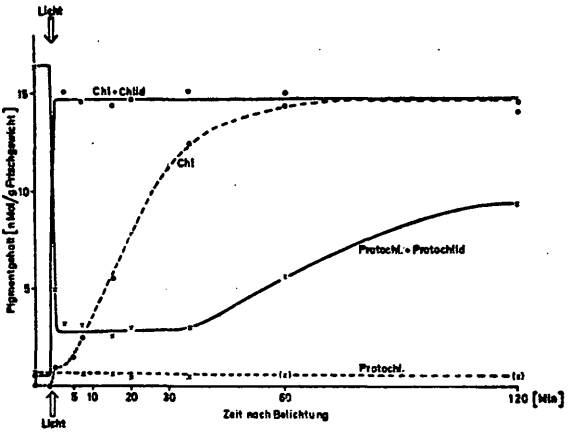

Abb. 5: Akkumulation von Chlorophyllen in etiolierten Haferblättern nach 1 Min. Belichtung mit Weißlicht. Chl + Chlid = Gesamt-Pigment mit dem Spektrum von Chlorophyll a, Chl = (verestertes) Chlorophyll a, die Differenz ist jeweils (unverestertes) Chlorophyllid a.
Entsprechend bedeutet Protochl. + Proto = Gesamt-Pigment mit dem Spektrum von Protochlorophyll, Protochl. = (verestertes) Protochlorophyll. Das veresterte Chlorophyll enthält unter diesen Bedingungen 4 Alkohole (Strukturen in Abb. 2) (nach SCHOCH et al. 1977).

ger als bei der Pigmentakkumulation im Dauerlicht (vgl. Abb. 4), daher waren empfindliche analytische Nachweisverfahren erforderlich. Zur Prüfung auf die im Chlorophyll enthaltenen Alkohole wurde die Pigmentfraktion zunächst verseift, die Alkohole wurden gaschromatographisch nachgewiesen (SCHOCH et al. 1977). Später wurde

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

die Hochdruckflüssig-Chromatographie zur direkten Auftrennung der Chlorophyll-Fraktion verwendet (SCHOCH et al. 1978, SCHOCH 1978). Übereinstimmend ergab sich, daß während der Veresterungsphase 4 Alkohole im Chlorophyll nachzuweisen sind, die massenspektrometrisch als Geranylgeraniol, Dihydrogeranylgerianol, Tetrahydrogeranylgeraniol und Phytol identifiziert wurden. Die Lage der Doppelbindungen konnte an einem Beispiel eindeutig festgelegt werden (SCHOCH und SCHÄFER 1978).

Während der Versuchsdauer fand offensichtlich eine Hydrierung der Alkohole am Pigment statt: Während die ersten 3 Alkohole sich nur zwischenzeitlich anhäuften, wurde Phytol kontinuierlich akkumuliert. Nach 2 Stunden enthielt das Chlorophyll praktisch nur noch Phytol. Genaue kinetische Untersuchungen bei Hafer- und bei Bohnenkeimlingen (SCHOCH et al. 1977, SCHOCH 1978) machten eine Hydrierung von Geranylgeraniol, gebunden an Chlorophyllid, über die Zwischenstufen bis zum Phytol wahrscheinlich (Abb. 6).

Interessant erscheint uns, daß man die Hydrierung offensichtlich von der Veresterung trennen kann: Keimlinge, die während der Dunkelperiode anaerob gehalten wurden, zeigen zwar eine unveränderte Veresterungskinetik, jedoch akkumulieren Sie Geranylgeraniol-haltiges Chlorophyll (HEHLEIN 1979). Erst nach längerer Zeit unter aero-

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

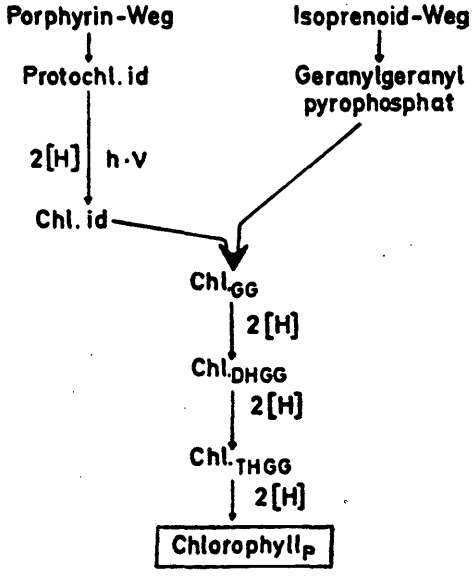

Abb. 6: Schema der Chlorophyll-Biosynthese (nach SCHOCH et al. 1977). Die Vorstufe Geranylgeranylpyrophosphat ergab sich aus Versuchen **in vitro** (s. unten).

ben Bedingungen geht dieses in Phytol-haltiges Chlorophyll über.

Mit diesen Versuchen ist nachgewiesen worden, daß — zumindest bei Beginn des Ergrünens nach einer Dunkelphase — Geranylgeraniol der erste im Chlorophyll nachzuweisende Alkohol ist. Es erhob sich nun die Frage, ob der freie Alkohol oder ein Derivat (z. B. der Pyrophosphor-Ester)

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

als Substrat für das veresternde Enzym dient. Für die Untersuchung einer solchen Substratabhängigkeit diente uns ein in-vitro-System, welches im Prinzip den obigen **in-vivo**-Experimenten entsprach: Es enthielt Etioplasten, die entweder kurz vor dem Zellaufschluß (also noch **in vivo**) oder erst danach (also **in vitro**) Lichtblitze erhielten, damit das Protochlorophyllid in Chlorophyllid a umgewandelt wurde. Die Etioplasten wurden dann durch einen osmotischen Schock lysiert, damit keine Permeabilitätsgrenzen für lösliche Substrate mehr existierten. Endogene lösliche Substrate wurden dabei weitestgehend herausgelöst und mußten durch exogene Substrate ersetzt werden. Erste Vorversuche bei Mais (RÜDIGER et al. 1977) wurden bei Hafer bestätigt und erweitert (BENZ 1979). Es zeigte sich, daß freies Geranylgeraniol oder der Monophosphorsäure-Ester nicht zur Veresterung herangezogen werden, wohl aber der Pyrophosphorsäure-Ester (Tab. 1). Das System enthält aber Kinasen, die den freien Alkohol und das Monophosphat mit ATP zum Pyrophosphat umsetzen: In Gegenwart von ATP werden alle diese Substrate zur Veresterung von Chlorophyllid akzeptiert. Das veresternde Enzym ist von Chlorophyllase verschieden, da diese keine Pyrophosphate akzeptiert (WELLBURN 1970). Ferner sind die Reaktionsbedingungen verschieden: Chlorophyllase benötigt für die enzymatische Aktivität eine hohe

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

angebotenes Substrat	Veresterungsrate % des Gesamt-Chlorophyllids	spezifische Radioaktivität von Chlorophyll GG % des eingesetzten ^{3}H-GG
Geranylgeraniol	18	10
Geranylgeranylmonophosphat	36	18
Geranylgeranylpyrophosphat	83	99
Geranylgeraniol + ATP	80	101
Geranylgeranylmonophosphat + ATP	78	102
Geranylgeranylpyrophosphat + ATP	84	99

Tab. 1: Spezifität des veresternden Enzym-Systems aus Hafer-Etioplasten. Etioplasten-Fraktionen werden kurz belichtet, das durch Photokonversion gebildete Chlorophyllid a wird durch zugesetztes Substrat in einer nachfolgenden Dunkelperiode von 1 h verestert(nach BENZ 1979).

Konzentration an organischen Lösungsmitteln (z. B. Aceton oder Methanol) oder an Detergentien, während das hier untersuchte veresternde Enzym seine optimale Wirksamkeit in wäßrigen, gepufferten Systemen entfaltet.

Die Spezifität beschränkt sich nicht nur auf Pyrophosphorsäure-Ester, sondern auch auf das zweite Substrat: Während Chlorophyllid verestert wird, reagiert Protochlorophyllid (auch im Gemisch mit ersteren) nicht oder nur extrem langsam (RÜDIGER und GUTHOFF, unveröffentlicht). Diese Spezifität könnte die oben er-

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

wähnte lichtregulierte Koordination von Porphyrin- und Isoprenoid-Akkumulation auf einfache Weise erklären: Phytol wird nur in der Ester-Form des Pigments gebildet, der Ester bildet sich aber erst nach der Photoumwandlung von Protochlorophyllid zu Chlorophyllid.

Dagegen ist die Spezifität für den verwendeten Alkohol nicht so groß: Neben dem Pyrophosphorsäure-Ester von Geranylgeraniol wird auch der von Phytol, ja sogar — allerdings wesentlich schlechter — der von Farnesol vom Enzym akzeptiert (BENZ 1979). Damit wurde zum ersten Mal Farnesol-haltiges Chlorophyll mit Hilfe eines Enzyms aus höheren Pflanzen dargestellt. Dieses Chlorophyll kommt bei höheren Pflanzen **in vivo** aber nicht vor. Das bedeutet, daß Farnesylpyrophosphat, das als Vorstufe von Sterolen eine wichtige Rolle im Stoffwechsel spielt, **in vivo** offensichtlich nicht mit Chlorophyllid und dem veresternden Enzym in Berührung kommt, sondern durch Kompartimentierung davon getrennt bleibt. Neben Geranylgeraniolpyrophosphat kommt nach diesen Versuchen auch Phytylpyrophosphat als Substrat für die Veresterung von Chlorophyllid **in vivo** in Frage. Welches der Substrate unter welchen Versuchsbedingungen wirklich herangezogen wird, kann erst entschieden werden, wenn die endogenen pool-Größen dieser Substrate und ihre Änderungen während der Veresterung genau bestimmt worden sind.

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

Die hier zitierten Arbeiten des Autors wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn-Bad Godesberg, unterstützt.

Literaturverzeichnis

BENZ, J., 1979: Dissertation Univ. München (in Vorbereitung)

BOGORAD, L., 1976: Chlorophyll Biosynthesis. In: T. W. Goodwin (Ed.), Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, Vol. 1, p. 64—148. Academic Press London

CHIBA, Y., I. AIGA, M. IDEMORI, Y. SATOH, K. MATSUSHITA und T. SASA, 1967: Studies on chlorophyllase of Chlorella protothecoides I. Enzymatic phytylation of methyl chlorophyllide. Plant Cell Physiol. Tokyo 8, 623—635

HEHLEIN, C., 1979: Einfluß der Anaerobiose auf die Chlorophyllbiosynthese bei ergrünenden Haferkeimlingen. Zulassungsarbeit Univ. München

ELLSWORTH, R. K., 1971: Studies on chlorophyllase I. Hydrolytic and esterification activities of chlorophyllase from wheat seedlings. Photosynthetica 5, 226—232

ELLSWORTH, R. K., 1972: Studies on chlorophyllase III. Differences in gel chromatographic behavior of the hydrolytic and esterification activities obtained from wheat seedlings. Photosynthetica 6, 276—281

RÜDIGER, W. und J. BENZ, 1979: Influence of aminotriazol on the biosynthesis of chlorophyll and phytol. Z. Naturforsch., im Druck

RÜDIGER, W., J. BENZ, U. LEMPERT, S. SCHOCH und D. STEFFENS, 1976: Hemmung der Phytol-Akkumulation mit Herbiziden. Geranylgeraniol- und Dihydrogeranylgeraniol-haltiges Chlorophyll aus Weizenkeimlingen. Z. Pflanzenphysiol. 80, 131—143

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

RÜDIGER, W., P. HEDDEN, H.-P. KÖST and D. J. CHAPMAN, 1977: Esterification of chlorophyllide by geranylgeranyl pyrophosphate in a cell-free system from maize shoots. Biochem. Biophys. Res. Commun. **74**, 1268—1272

SCHOCH, S., 1978: The Esterification of Chlorophyllide a in Greening Bean Leaves. Z. Naturforsch. **33c**, 712—714

SCHOCH, S. und W. SCHÄFER, 1978: Tetrahydrogeranylgeraniol, a Precursor of Phytol in the Biosynthesis of Chlorophyll a — Localization of the Double Bonds. Z. Naturforsch. **33c**, 408—412

SCHOCH, S., U. LEMPERT und W. RÜDIGER, 1977: Über die letzten Stufen der Chlorophyll-Biosynthese Zwischenprodukte zwischen Chlorophyllid und phytolhaltigem Chlorophyll. Z. Pflanzenphysiol. **83**, 437—436

SCHOCH, S., U. LEMPERT, H. WIESCHOFF and H. SCHEER, 1978: High-Performance Liquid Chromatography of Tetrapyrole Pigments. Pheophytins Esterified With Different Diterpene Alcohols, Isomeric Biliverdins and Synthetic Bilins. J. Chromatography **157**, 357—364

STEFFENS, D., 1975: Untersuchungen zur Biosynthese des Chlorophylls. Dissertation Univ. München

STEFFENS, D., I. BLOS, S. SCHOCH und W. RÜDIGER, 1976: Lichtabhängigkeit der Phytoakkumulation. Ein Beitrag zur Frage der Chlorophyllbiosynthese. Planta (Berl.) **130**, 151—158

WATTS, R. B. and R. G. O. KEKWICK, 1974: Factors affecting the formation of phytol and its incorporation into chlorophyll by homogenates of the leaves of the French bean Phaseolus vulgaris. Arch. Biochem. Biophys. **160**, 469—475

WELLBURN, A. R., 1970: Studies on the esterification of chlorophyllides. Phytochemistry **9**, 2311—2313

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Schriften des Vereins zur Verbreitung naturwissenschaftlicher Kenntnisse Wien

Jahr/Year: 1980

Band/Volume: 119_120

Autor(en)/Author(s): Rüdiger Wolfhart

Artikel/Article: Neue Aspekte der Chlorophyll-Biosynthese. 23-38