

Enige voorbeelden van het gebruik van tracers in het fotosynthese-onderzoek

B. KOK

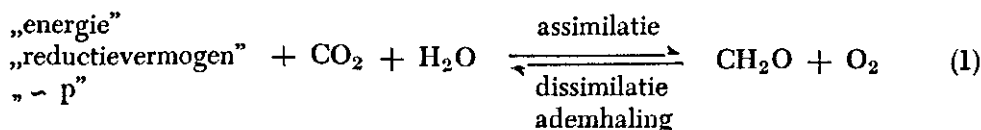
Werkgroep Zonneënergie T.N.O., Laboratorium voor Plantenfysiologisch
Onderzoek der Landbouwhogeschool, Wageningen

Enige voorbeelden van het gebruik van tracers in het fotosynthese-onderzoek

B. KOK
 Werkgroep Zonneënergie T.N.O.,
 Laboratorium voor Planten-
 fysiologisch Onderzoek der Land-
 bouwhogeschool, Wageningen.

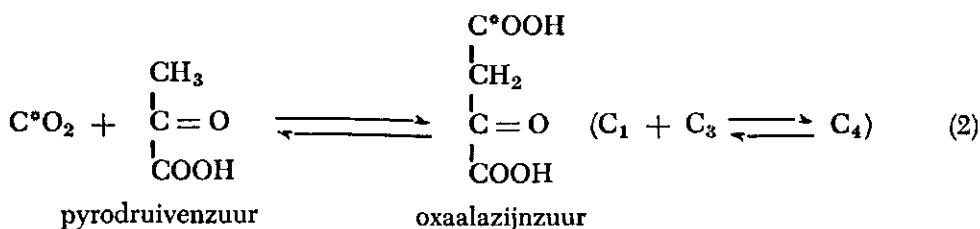
I NIEUWERE INZICHTEN IN HET PROCES VAN DE FOTOSYNTHESE

Een belangrijke vergroting van onze kennis der koolzuurassimilatie is mogelijk geworden door toepassing van isotopen. De fotosynthese is in het geheel niet het enige, maar wel kwantitatief het belangrijkste proces waarbij koolzuur wordt geassimileerd. De grondvergelijking wordt als volgt weergegeven:



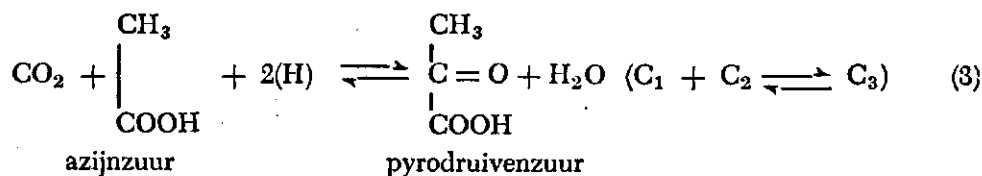
De reactie naar links is verbranding en levert energie; naar rechts is het reductie en vereist energie, die in allerlei vormen geleverd kan worden; licht is kwantitatief weer het belangrijkste, maar b.v. oxydatie van mineralen zoals zwavel kan het proces ook bekostigen. In de fotosynthese wordt zuurstof uitgedreven en brandbare stof blijft over.

Vergelijking (1) is een bruto vergelijking. In werkelijkheid zijn er allerlei tussentrappen; zo kan onder omstandigheden in het licht wel O_2 worden uitgedreven, maar geen koolzuur gereduceerd. Ook is opname van koolzuur nog geen reductie. Het koolzuur wordt eerst aan een bestaand skelet gebonden, ongeveer zoals een tak op een boom kan worden geënt. WOOD en WERKMAN ontdekten in 1935 de volgende reactie:



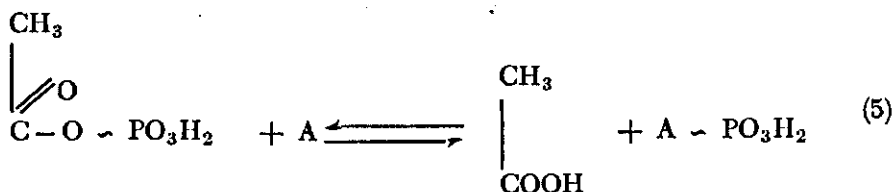
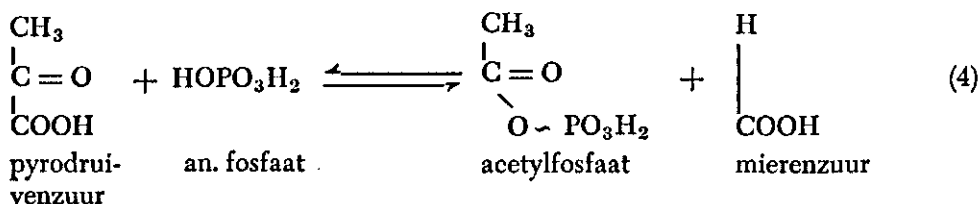
Met tracer-koolzuur is later bewezen dat het koolzuur terecht komt in de carboxylgroep, die met een sterretje is aangegeven; de reactie kost en levert ook geen energie. Zulk een „enting” (carboxylatie) gaat vaak vooraf aan een reductie.

Een tweede voorbeeld, waarbij echter tegelijkertijd reductie plaats vindt, is het volgende (LIPMANN, 1941):



Hier is waterstof nodig, want een zuurgroep wordt gereduceerd tot een ketogroep (C = O). De nodige (of in andere, dissimilatoire reacties vrijkomende) waterstof wordt in de cel aan- of afgevoerd door coënzymen zoals DPN en TPN, die al naar behoefte geoxydeerd of gereduceerd kunnen worden op verschillende plaatsen, met behulp van specifieke enzymen. Deze reacties zijn vaak reversibel, de richting waarin zij gaan hangt dan af van de concentratie-verhoudingen op de verschillende plaatsen in de cel.

Een tweede transportsysteem van energie in de cel is het fosfaatsysteem. Een voorbeeld is het volgende (LIPMANN, 1946):



De ontleding van pyrodruivenzuur tot azijnzuur en mierenzuur in vitro is een energieleverende reactie; de reageerbuis waarin zij verloopt wordt warm. Deze warmteontwikkeling is echter niet het doel van het metabolisme. Warmte is diffuse energie, en dus verloren. De cel vormt dan ook in eerste instantie (4) geen azijnzuur, maar een fosforzure verbinding, een instabiel zuuranhydride, waarin de energie gevangen is die anders verloren zou gaan. Nu beschikt de cel weer over andere enzymen die deze „energierijke” fosforzurgroep kunnen overnemen, acceptoren, zoals adenylzuur en creatine; uiteindelijk komt in bovenstaand voorbeeld (5) toch azijnzuur vrij, maar de energie blijft gevangen en kan elders nuttig besteed worden.

In het algemeen krijgt de cel de verbrandingsenergie ter beschikking in deze twee vormen: PNH, en energierijk fosfaat (het laatste vaak aangeduid als $\sim p$). De tweede eenheid is 3 tot 4 maal zo klein als de eerste, wat nuttig is voor een zuinige economie.

Omgekeerd kan nu, als voldoende (H) en $\sim p$ aanwezig is, koolzuur gereduceerd worden.

Fig. 1 geeft het schema van een deel van de aërobe ademhaling. Deze serie reacties wordt ingeleid door de splitsing van zetmeel, sucrose, hexose tot triose; dit deel levert geen energie. De oxydatie van triose tot P-glycerinezuur levert

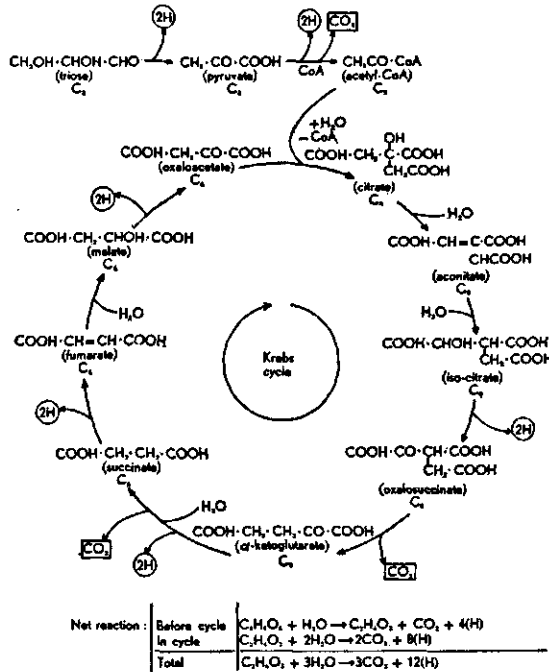
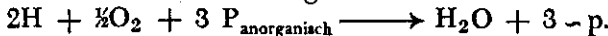


FIG. 1 AFBRAAK VAN EEN C₆-MOLECULE TOT KOOLZUUR, WAARBIJ (H) WORDT VRIJGEMAAKT (KREBS-CYCLUS).

(H) en ~p. Dan ontstaat pyrodruivenzuur, waaruit koolzuur verdwijnt, en weer 2 (H) verdiend worden. C₂ ~p combineert met oxaalzijnzuur (C₄) tot citroenzuur, en via een reeks omkeerbare stappen wordt dit afgebroken tot er weer OAZ is teruggevormd. Daarbij wordt telkens (H) en ~p gespaard, terwijl CO₂ wordt afgesplitst. De cel kan nu met de verkregen energie-eenheden de nodige processen bekostigen, zoals b.v. eiwitproductie. Ook kan zij een deel van de (H) omzetten in kleinere energie-eenheden.



De Krebs-cyclus is omkeerbaar. Met tracers is bewezen dat gedurende de ademhaling ook koolzuur naar binnen gaat!

Het lag nu voor de hand te veronderstellen dat de fotosynthese het omgekeerde zou zijn van de ademhaling. Als (H) en ~p door het licht in voldoende mate werden gevormd, zou het wiel andersom kunnen gaan lopen. Dit bleek niet te kloppen: geeft men C^{*}O₂ aan de groene cel in het licht, dan worden de tussenprodukten van de Krebs-cyclus niet snel gemerkt.

Rond 1940 pionierden RUBEN, KAMEN en HASSID met C¹¹. Dit heeft een halveringstijd van ongeveer 20 minuten, wat te kort is om een behoorlijke analyse van de gemerkte produkten te maken. Wel bleek dat reeds in zeer korte tijd veel produkten radioactief worden.

2 DE PAPIERCHROMATOGRAFIE

Nadat het C¹⁴ (met een halveringstijd van ongeveer 5000 jaar) was gevonden, zijn belangrijke vorderingen gemaakt. Speciaal een grote groep wer-

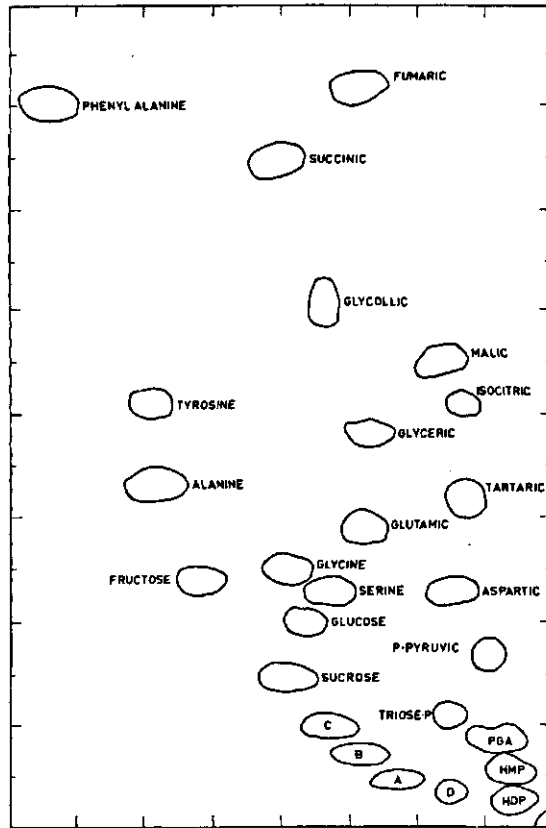
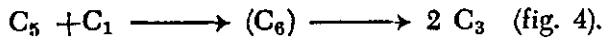


FIG. 2 VOORBEELD VAN DE VERDELING VAN DIVERSE FOTOSYNTHETISCHE TUSSENPRODUKTEN OVER EEN TWEE-DIMENSIONAAL PAPIERCHROMATOGRAM (volgens CALVIN *et al.*, 1950).

kers in Berkeley onder leiding van CALVIN moet genoemd worden. Behalve het C^{14} hadden zij een tweede elegant hulpmiddel, de papierchromatografie. De chromatografie, het eerst door TSWETT toegepast, was rond 1945 door de Nobelprijswinnaars MARTIN en CONSDEN vereenvoudigd tot papierchromatografie. Het beginsel hiervan is bekend aan ieder die op school wel eens een inktvlek in vloeipapier heeft opgezogen. In het algemeen worden verschillende verbindingen verschillend sterk aangetrokken door het papier en het capillair opstijgende oplosmiddel. Het gevolg is een verschil in „loopsnelheid” over het papier, dus een scheiding. Heeft men een aantal vlekken op een rij, dan kan men het papier drogen, een kwart slag draaien en een ander oplosmiddel laten lopen, zodat nieuwe scheidingen kunnen ontstaan. Fig. 2 geeft de „landkaart” van de Berkeley-groep, die wel een indruk geeft van wat met deze methode mogelijk is. Zijn er nu radioactieve verbindingen, dan kan men die lokaliseren door het chromatogram een tijdje op röntgenfilm te leggen. Omdat veel celproducten fosfor bevatten kan men bovendien merken met P^{32} ; dit is een harde straler, die ook de achterzijde van de röntgenfilm zwart, in tegenstelling tot C^{14} ; op deze wijze kan men beide isotopen tegelijk toepassen.

De gang van zaken bij zo'n experiment is nu de volgende. Een hoeveelheid

groene cellen wordt belicht, op een gegeven ogenblik geeft men een dosis $C^{14}O_2$ en na enige tijd doodt men de cellen in kokende alcohol. Het extract wordt ingedampt, en een papierchromatogram ontwikkeld. Fig. 3a toont, welke verbindingen gemerkt zijn na één minuut fotosynthese. Dat zijn er heel wat. Om een eerste fotosyntheseprodukt te vinden moet men veel korter belichten. Fig. 3b toont het resultaat na 10 seconden. Er zijn vooral drie vlekken; de dikste is fosfoglycerinezuur (PGZ), dan komen ribulose-difosfaat en sedoheptulosefosfaat, daarna nog wat aminozuren (een bewijs dat het koolzuur snel in het eiwitmetabolisme wordt betrokken). We bepalen ons tot de eerste 3 produkten. Volgens de laatste gegevens is het eerste produkt dat gemerkt wordt het fosfoglycerinezuur, dat ontstaat uit ribulosedifosfaat en CO_2 :



Het tussenprodukt (C6) is zo instabiel dat het nog niet bekend is geworden. Het CO_2 is in het PGZ nog aanwezig als COOH-groep, dus nog niet gereduceerd. De volgende stap is :

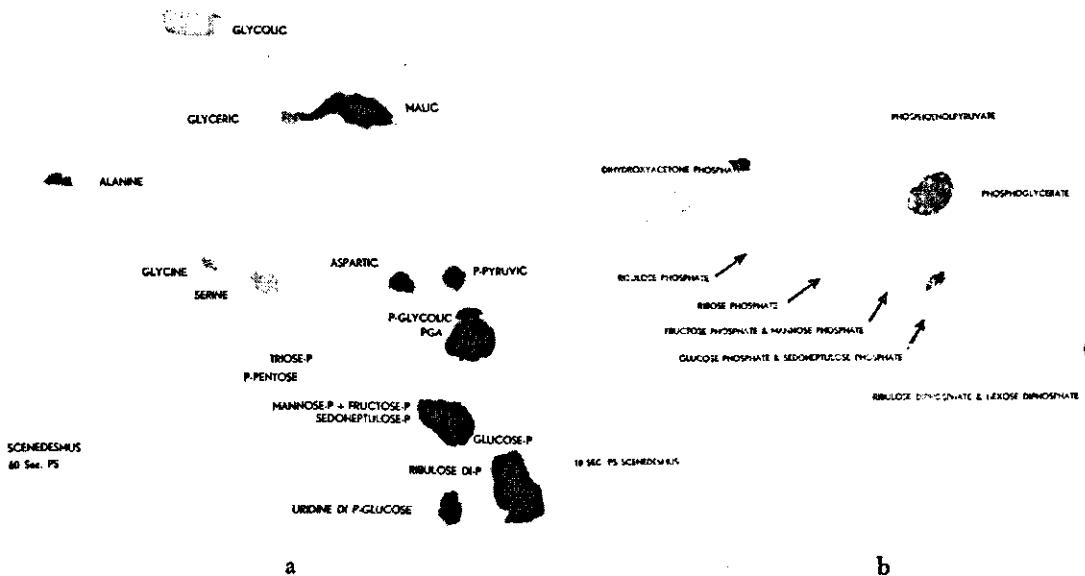
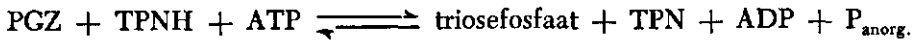


FIG. 3a EN b AFDRUKKEN VAN PAPIERCHROMATOGRAMMEN OP RÖNTGENFILM, GEMAAKT NA TOEDIENING VAN RADIOACTIEF KOOLZUUR. Bovenste figuur: 60 seconden, onderste: 10 seconden fotosynthese in $C^{14}O_2$ (volgens CALVIN *et al.*, 1951).

Triosefosfaat kan, zonder dat verder energie nodig is, in suiker en zetmeel worden omgezet. Nu moet de C_5 -verbinding voortdurend geregenereerd wor-

den, waarvoor een deel van het gevormde C_3 nodig is. Er is hiervoor een fraai schema ontworpen, dat hier onder het nodige voorbehoud zeer summier wordt weergegeven :

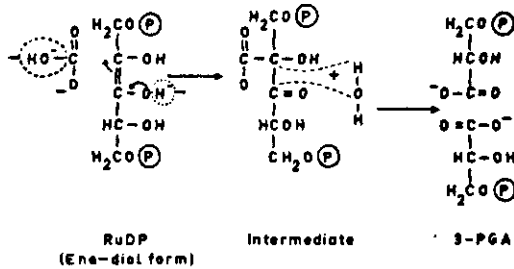
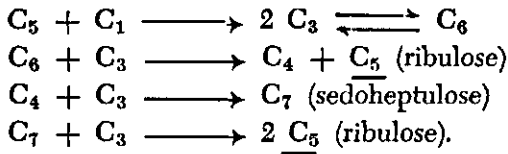


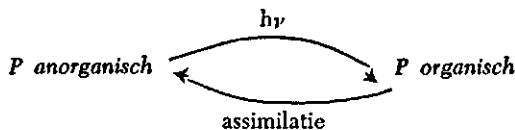
FIG. 4 DE EERSTE STAP VAN DE KOOLZUUROPNAME IN DE FOTOSYNTHESE (VOLGENS CALVIN, 1955).

Het laatste woord hierover is nog niet gesproken. Hoe dit ook zij, de toepassing van tracers opende hier de weg voor een bijzondere verdieping van ons inzicht, althans in de biochemie van fotosynthese.

3 DE HYPOTHESE VAN VASTLEGGING VAN LICHTENERGIE DOOR FOSFAAT

Een ander voorbeeld: er is enige jaren geleden een hypothese opgesteld, dat het eerste chemische produkt waarin lichtenergie door de planten wordt vastgelegd, energierijk fosfaat $-p$ zou zijn. Er was immers gebleken dat de planten niet het monopolie van CO_2 -reductie hebben, maar wel het unieke vermogen daartoe licht te kunnen benutten. De gang van zaken zou dan aldus zijn: $h\nu + P_{an} \longrightarrow 1 \text{ of } 2 -p$; met een deel van het $-p$ zou dan weer TPN gereduceerd kunnen worden, waarbij het fosfaat zou vrijkomen. TPNH en $-p$ samen zouden dan de reductie kunnen verrichten.

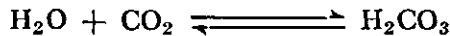
Dit zou meebrengen dat de fosfaatomzetting in het licht zeer intensief zou zijn: $\text{Acceptor} + P_{an} \rightleftharpoons A -p$, anorganisch fosfaat zou voortdurend overgaan in organisch en v.v. De verhouding anorganisch/organisch P hoeft daarbij in het licht en het donker niet belangrijk te verschillen. Wel zou, als gemerkt anorganisch P werd toegediend, de verdeling over anorganisch en organisch fosfaat in het licht veel sneller een evenwicht moeten bereiken dan in het donker; de specifieke activiteiten zouden sneller gelijk moeten worden. Door op verschillende ogenblikken de specifieke activiteiten te controleren kan men zo de snelheid van een kringproces beoordelen.



Het is gebleken, dat de omloopsnelheid in het licht wel vergroot was, maar veel kleiner bleef dan volgens de hypothese vereist was. De aangegeven processen spelen dus hoogstens een ondergeschikte rol.

Een twistvraag is lang geweest, wat de bron is van de zuurstof die gedurende de fotosynthese vrijkomt: CO_2 dan wel H_2O . De in de dertiger jaren beschikbare gegevens wezen naar H_2O als de zuurstofbron.

RUBEN en medewerkers trachtten dit op te lossen door een zuurstofisotoop O^{18} aan te brengen, hetzij in het koolzuur, hetzij in het water. Tabel 1 toont het resultaat: de ontwikkelde zuurstof heeft steeds hetzelfde O^{18} -gehalte als het water. Hiermee lijkt de zaak uitgemaakt. Helaas is dit niet het geval. Er is namelijk, mol per mol, oneindig veel meer water dan zuurstof in het systeem, en uitwisseling kan optreden volgens



waardoor het O^{18} -gehalte van het koolzuur gelijk wordt aan dat van het water. Overigens, nog steeds wordt het water aangezien als de bron van de fotosynthese-zuurstof. Op de limiteringen van de nieuwe methoden moet echter ook worden gewezen.

Tabel 1 Isotopensamenstelling van door *Chlorella* bij belichting ontwikkelde zuurstof.

Proef No.	Substraat	Tijd in min tussen het oplossen van $\text{KHCO}_3 + \text{K}_2\text{CO}_3$ en begin van het verzamelen van O_2	Tijd in min bij het einde van het verzamelen van O_2	% O^{18} in		
				H_2O	$\text{HCO}_3 + \text{CO}_3$	O_2
1	KHCO_3 0,09 M K_2CO_3 0,09 M	0	110	0,85	0,20	..
		45	225	0,85	0,41 b	0,84
		110	350	0,85	0,55 b	0,85
		225		0,85	0,61	0,86
2	KHCO_3 0,14 M K_2CO_3 0,06 M	0		0,20		..
		40	110	0,20	0,50	0,20
		110	185	0,20	0,40	0,20
3	KHCO_3 0,06 M K_2CO_3 0,14 M	0		0,20	0,68	..
		10	50	0,20		0,21
		50	165	0,20	0,57	0,20

4 DE GASWISSELING DER GROENE PLANTEN

In de vorige voordracht heeft men kunnen zien, hoe met behulp van tracers werd aangetoond, dat de opname van ionen in de wortel de balans is van twee tegengestelde processen in dynamische verhouding. Iets dergelijks vinden we ook bij de gaswisseling der groene planten. In het donker vinden we: (ademhaling) zuurstofopname, koolzuurafgifte; in het licht: (fotosynthese) zuurstofafgifte, koolzuuropname. Bij een zekere lichtintensiteit is de gaswisseling nul. Dit doet de vraag rijzen of hier de ademhaling normaal is en gelijk aan de fotosynthese, of dat de ademhaling onderdrukt is, omdat de cel nu gemakkelijk aan energie kan komen. Dit zou men kunnen oplossen door toepassing van tracers. BROWN, in Minnesota, heeft hierover belangrijke gegevens verzameld. Hij werkte met een massaspectrograaf, een apparaat dat continue registratie mogelijk maakt van de concentratie van de te meten soort mole-

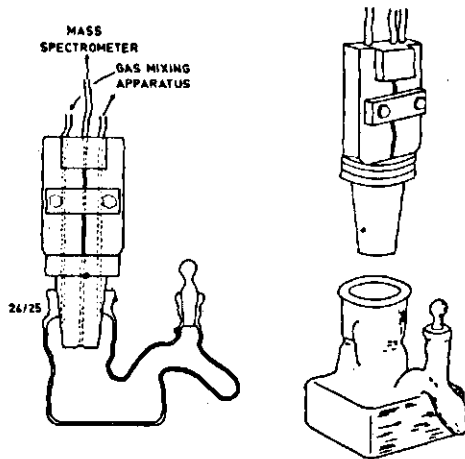


FIG. 5 NORMAAL WARBURG-VAATJE WAARIN EEN SUSPENSIE VAN B.V. GROENE ALGEN WORDT GEBRUIKT. Inplaats van met een manometer is de gasfase via een nauwe capillair verbonden met een massa-spectrometer, zodat de samenstelling ervan min of meer continu kan worden geregistreerd (volgens Brown, 1953).

culen. Het verloop van die concentratie tegen de tijd geeft dan de snelheid van opname of afgifte. In een experiment waren aanwezig: *Chlorella's* in gewoon water, CO_2 (mol. gewicht 44) en gemerkte zuurstof $\text{O}^{18}\text{O}^{16}$ massa 34, naast normale zuurstof $\text{O}^{16}\text{O}^{16}$ massa 32. Aangenomen nu dat er geen snelle uitwisseling is tussen de zuurstof uit het water en de gasfase, kan men verwachten, dat de normale ademhaling zich uit in een afname van de gemerkte

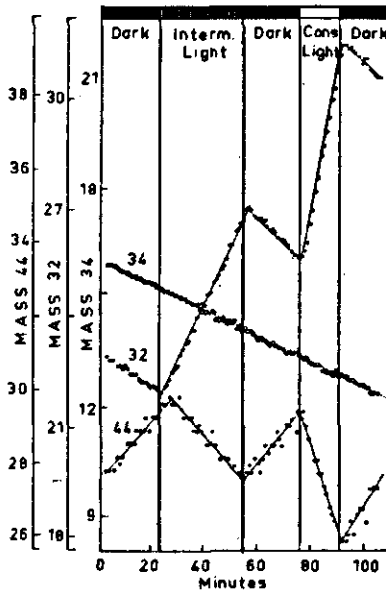


FIG. 6 DE MASSA-SPECTROGRAAF. Deze toont dat bij *Chlorella* de opname van $\text{O}^{18}\text{O}^{16}$ in licht en donker gelijk is, en er geen directe onderdrukking van de respiratoire zuurstofopname plaats vindt. De concentraties van CO_2 (massa 44) en $\text{O}^{16}\text{O}^{16}$ worden normaal door licht beïnvloed (Brown, 1953).

O_2 (massa 34), fotosynthese daarentegen in de produktie van normale O_2 , massa 32 (immers afkomstig uit water). Gedurende het experiment werden om beurten geregistreerd de concentraties van massa's 44, 32 en 34 in de gasfase. Figuur 6 toont het resultaat: massa 44 (CO_2) neemt toe in het donker en neemt af in het licht; massa 32 juist omgekeerd. Massa 34 neemt in het licht en donker gelijkelijk af. Conclusies:

- 1 de ademhaling gaat in het licht normaal door;
- 2 de ademhaling gebruikt niet preferent de zuurstof die gedurende de fotosynthese wordt geproduceerd.

In principe kan een dergelijke proef ook worden gedaan met gemerkt koolzuur. Behalve de uitwisseling merkt men dan echter ook nog een discriminatie-effect: de cel heeft nl. een zekere afkeer van C^{14} en gebruikt preferent C^{12} ; dit compliceert de proeven. Tussen O^{16} en O^{18} wordt kennelijk veel minder gediscrimineerd.

Het resultaat met *Chlorella* uit fig. 6 is niet algemeen geldend. Bij purperbacteriën blijkt de ademhaling in het licht onderdrukt te zijn (fig. 7). Bij nog andere organismen hangt het resultaat af van de proefcondities.

Tenslotte nog een aardig resultaat van BROWN en GOOD (1955). Het is bekend dat het reducerend vermogen in het licht kan ontstaan, ook als geen

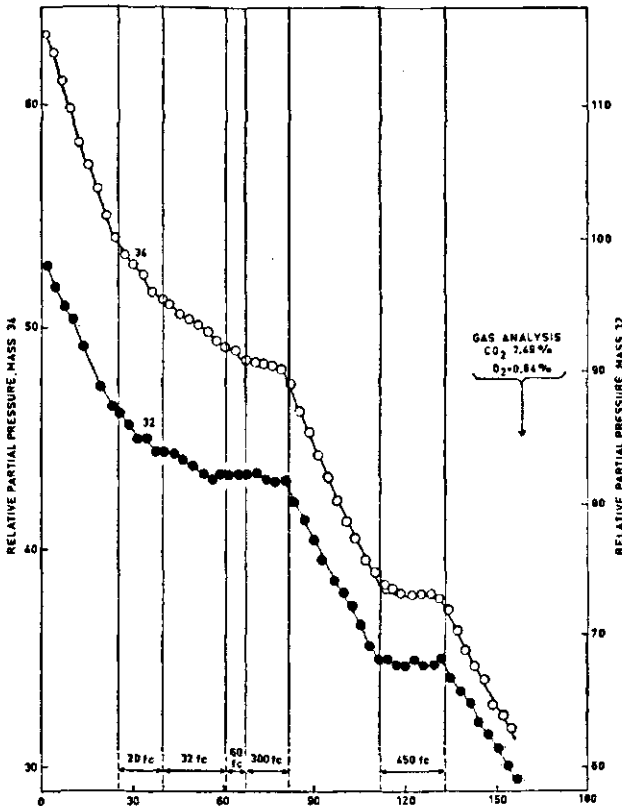


FIG. 7 ONDERDRUKING VAN DE ZUURSTOFOPNAME IN HET DONKER DOOR BELICHTING BIJ DE PURPERBACTERIE *Rhodospirillum rubrum* (volgens JOHNSTON EN BROWN, 1954).

koolzuur gereduceerd kan worden. Uit gedesintegreerde cellen kan men chloroplasten isoleren die geen koolzuur meer kunnen verwerken, maar in het licht wel bepaalde reducties kunnen verrichten: ferri- tot ferro, chinon tot hydrochinon b.v., waarbij ook zuurstof vrijkomt.

Nu stelt zich het probleem: hoe is de plant in staat het reduceervermogen (H) te beschermen tegen de geproduceerde zuurstof? Treedt er geen „kortsluiting” op, waardoor het in het licht gesplitste water weer opnieuw gevormd wordt? Het bleek dat deze kortsluiting inderdaad optreedt, maar uitsluitend wanneer geen reduceerbare stof aanwezig is. Als een kleine hoeveelheid chinon aanwezig is, wordt dit in het licht gereduceerd, terwijl zuurstof wordt ontwikkeld. Zodra het chinon verbruikt is houdt de gasproductie op. Het chloroplastensysteem is echter niet kapot, maar nu wordt zuurstof uit de gasfase gereduceerd in gelijk tempo als waarmee zuurstof uit water ontwikkeld wordt. Het manometrisch effect is nul, maar wanneer in de gasfase gemerkt O_2 (massa 34) aanwezig is ziet men met de spectrometer de opname hiervan beginnen op het moment dat het chinon op is, terwijl de produktie van normaal O_2 (massa 32) doorgaat.

LITERATUUR

- BROWN, A. H.: *Am. J. Bot.* 40 (1953) 719.
 — — AND N. GOOD: *Arch. Bioch. Bioph.* 57 (1955) 340.
 CALVIN, M.: Rap. 3me Congr. Int. Bioch., Bruxelles 1955, p. 211.
 — —, J. A. BASSHAM AND A. A. BENSON: *Fet. Proc.* 9 (1950) 524.
 — —, — —, — —, V. H. LYNCH, C. ONELLET, L. SCHON, W. STEPKA AND N. E. TOLBERT:
 Symp. Soc. exp. Biol. V (1951) 284.
 JOHNSTON, J. A. AND A. H. BROWN: *Plant Physiol.* 29 (1954) 177.
 RUBEN, S., M. RANDALL, M. KAMEN AND J. L. HYDE: *J. Am. Chem. Soc.* 63 (1941) 877.

DISCUSSIE

WASSINK: Opgemerkt werd dat, hoewel de proeven met isotopen dienaangaande niet alle eenduidig uitvallen, toch met zekerheid kan worden aangenomen, dat alle O uit H_2O afkomstig is. Is dit werkelijk met zekerheid uitgemaakt?

INLEIDER: Hoewel iedereen aanneemt dat de zuurstof volledig uit het water komt, heeft men het strikte bewijs, ook met latere isotoop-experimenten, niet kunnen leveren.

VISSER verneemt nu voor het eerst, dat planten liever C^{12} dan C^{14} hebben. Daarom rijst bij hem twijfel of andere tracers door planten en dieren even goed worden opgenomen als de gewone atomen.

INLEIDER: Tracermethoden hebben hun charmes, maar (als elke andere methode) ook beperkingen en voetangels; zij zijn stellig geen panacee. Vele tracers zijn voor biologisch werk nagenoeg onbruikbaar, vooral lichtere elementen (b.v. H^2 , H^3).

FRISSEL: Wat is het reactiemechanisme tussen triose en hexose?

INLEIDER: Hiervoor wordt verwezen naar de originele literatuur. Vele van deze reacties zijn reeds lang geleden bekend geworden.

DE LOOSE: Is het vormingsschema van een C_5 -suiker over de voorafgaande synthese van een C_7 -, niet in strijd met het principe van een minimum aan energieverbruik?

INLEIDER: We zien heel vaak dat de cel gecompliceerdere wegen gebruikt dan op het eerste gezicht, althans naar onze begrippen, nodig lijkt. Toch is veelal de efficiëntie van dergelijke processen onverwacht gunstig.