

Zur photosynthetischen CO₂-Fixierung von *Synechococcus*

Photosynthetic CO₂ Fixation of *Synechococcus*

Günter Döhler

Botanisches Institut der Universität Frankfurt am Main, Siesmayerstr. 70, D-6000 Frankfurt a. M.

Z. Naturforsch. **35 c**, 978–981 (1980); eingegangen am 27. August 1980

¹⁴CO₂ Fixation, Effect of Preillumination and Temperature, *Synechococcus*

The cyanobacterium *Synechococcus* (*Anacystis nidulans* strain L 1402-1) was grown at +37 °C in 3.0 vol.% CO₂. The effect of preillumination with white light on the subsequent dark ¹⁴CO₂ fixation was studied under aerobic conditions at +30 °C. The radioactive carbon first incorporated into 3-phosphoglyceric acid was transferred during the later periods of dark ¹⁴CO₂ fixation to phosphoenolpyruvate and aspartate. No labelling or a very low label in sugar monophosphates could be observed. During the dark/light transients the initial fixation product was mainly aspartate. The pattern of ¹⁴C-incorporation into photosynthetic products under steady state conditions (10 min photosynthesis) varied with the temperature during the experiments. The radioactive carbon was firstly incorporated into 3-phosphoglyceric acid. During the later periods of photosynthetic ¹⁴CO₂ fixation an increased ¹⁴C-incorporation into aspartate and glutamate could be observed. Our findings were interpreted with operating of a phosphoenolpyruvate carboxylation besides the Calvin cycle.

Die autotrophe CO₂-Fixierung wurde bisher nur an einigen prokaryotischen Mikroorganismen untersucht [1]. Der Einbau des Kohlenstoffs erfolgt bei den Cyanobakterien (= Blaualgen) vornehmlich in die Produkte des Calvin-Cyclus [2, 3]. Außerdem wurde eine lichtbetriebene Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat vor allem während der Photosynthese-Induktion beobachtet [4]. Entscheidend für den ¹⁴C-Einbau in die Photosyntheseprodukte sind die Bedingungen während der Anzucht (0,03 oder 3,0 Vol.% CO₂) und während des Experiments (CO₂-Konzentration, O₂-Gehalt, Temperatur) [5]. Danach begünstigen CO₂- und O₂-Konzentration, [5, 6] sowie hohe Temperaturen die Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat, die analog zum C₄-Weg der Photosynthese verläuft. Um weitere Hinweise über den Weg der CO₂-Fixierung bei *Synechococcus* zu erhalten, haben wir den ¹⁴C-Einbau in die wasserlöslichen Photosyntheseprodukte nach einer Vorblichungsphase bei verschiedenen Temperaturen untersucht.

Experimentelles

Das Cyanobakterium *Synechococcus* (*Anacystis nidulans* Stamm L 1402-1) der Algenreinkultursammlung Göttingen wurde bei +35 °C und einem

Licht/Dunkel-Wechsel von 16:8 h unter Begasung mit 3,0 Vol.% CO₂ in einem Lichtthermostat der Firma Kniese, Marburg bei Schwachlicht (6000 Lux) kultiviert. Für die ¹⁴CO₂-Fixierungsexperimente wurden *Synechococcus*-Zellen einer rasch wüchsigen Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase verwandt und vor Versuchsbeginn 1 h im Dunkeln mit Preßluft (0,03 Vol.% CO₂) durchströmt. Die Durchführung der ¹⁴C-Versuche, die dünnenschichtchromatographische Auftrennung der Extrakte und die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte nach der bei Döhler [7] ausführlich beschriebenen Prozedur.

Ergebnisse und Diskussion

Während der Photosynthese-Induktion wird bei Temperaturen von +30 °C oder +35 °C am Anfang der Belichtung ¹⁴C-Bicarbonat in hohem Maße in Aspartat eingebaut. Nach 30 sec dominieren die Produkte des Calvin-Cyclus, d. h. 3-Phosphoglycerinsäure und die Zuckermorphosphate (vgl. Abb. 1 Teil A). Glukose-1-phosphat/Glukose-6-phosphat waren nach 30 sec und Fruktose-6-phosphat nach 50 sec ¹⁴C-markiert. Der negative Verlauf der Kurven für Aspartat und 3-Phosphoglycerinsäure deuten darauf hin, daß der ¹⁴C-Einbau über die Phosphoenolpyruvat-Carboxylierung mit dem Folgeprodukt Aspartat und über den Calvin-Cyclus offensichtlich gleichzeitig erfolgt. Die Markierung von Glycin/

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. G. Döhler.

0341-0382/80/1100-0978 \$ 01.00/0

Serin (ab 20 sec) geht hier nicht auf den Glykolatweg zurück, da Radioaktivität in Phosphoglykolat (nach 1 min) und Glykolat (nach 2 min) erst nach längeren Photosyntheseperioden auftrat. Für diese Aminosäuren kommt der Syntheseweg über 3-Phosphoglycerinsäure in Betracht. Auch wurde ein frühzeitiger ¹⁴C-Einbau in Glutamat (nach 20 sec) und Phosphoenolpyruvat (nach 30 sec) gefunden.

Nach einer Belichtungsperiode von 1 oder 5 min (d. h. erst danach erfolgte die ¹⁴C-Bicarbonat-Fütterung) wurde eine deutliche Veränderung im Muster des prozentualen Anteils der einzelnen Substanzen in der darauffolgenden Dunkelperiode beobachtet (Abb. 1 Teil B). Besonders auffällig ist die drastische Abnahme bzw. das Fehlen der ¹⁴C-Markierung von Zuckermomonophosphaten. Ab 30 sec fanden wir Fruktose-1.6-bisphosphat (1%) und Sedoheptulose-1.7-bisphosphat, was mit dem Ablauf des oxidativen Pentosephosphatweges erklärt werden kann

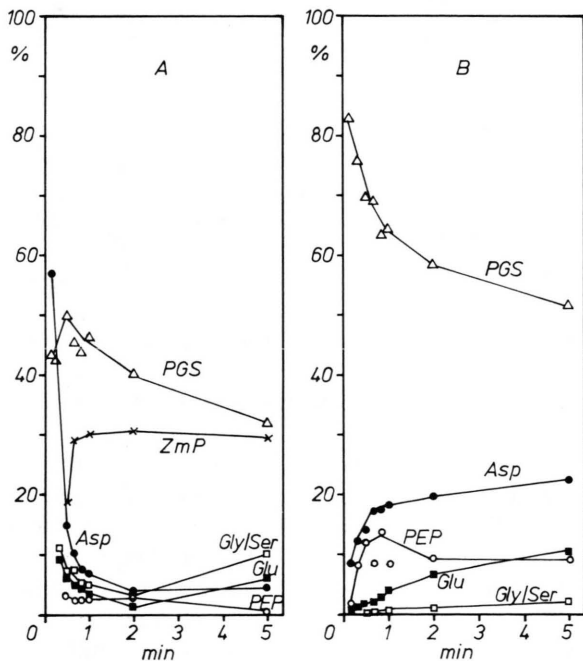


Abb. 1. Kinetik des ¹⁴C-Einbaues in verschiedene Substanzen (prozentuale Verteilung) während der Photosynthese-Induktion (Teil A) und der Dunkel-CO₂-Fixierung nach 5 min Vorbelichtung (Teil B) von *Synechococcus* (*Anacystis nidulans*, Stamm L 1402-1) bei +30 °C. Vor Versuchsbeginn wurde 1 h mit Prebluft (0,03 Vol.% CO₂) begast. Asp, Aspartat; Glu, Glutamat; Gly/Ser, Glycin/Serin; PEP, Phosphoenolpyruvat; PGS, 3-Phosphoglycerinsäure und ZmP, Zuckermomonophosphate.

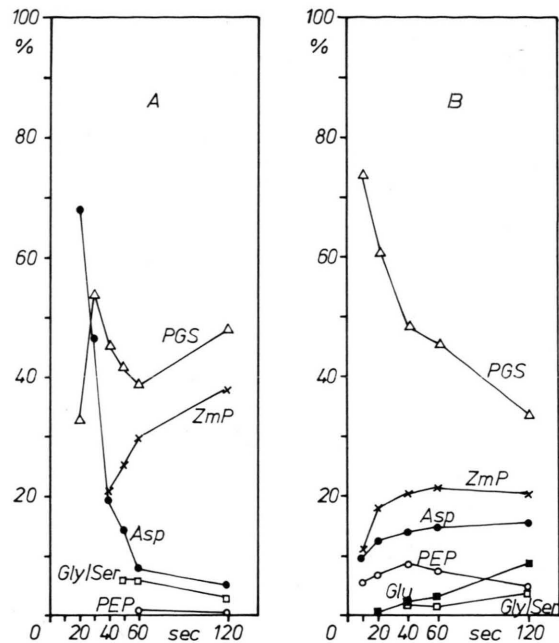


Abb. 2. Kinetik des ¹⁴C-Einbaues in verschiedene Substanzen (prozentuale Verteilung) während der Photosynthese-Induktion (Teil A) und der stationären Photosynthese nach 10 min (Teil B) von *Synechococcus* (*Anacystis nidulans*, Stamm L 1402-1) bei +35 °C. Weitere Angaben siehe Abb. 1.

[2]. Der mit zunehmender Fixierungsdauer auftretende Anstieg der Radioaktivität in Aspartat und Phosphoenolpyruvat zeigt, daß unter diesen Bedingungen, d. h. Dunkel-CO₂-Fixierung nach Vorbelichtung, beide Substanzen die ¹⁴C-Markierung von 3-Phosphoglycerinsäure erhalten haben. Die vorausgehende CO₂-Fixierung nach dem Calvin-Cyclus wird durch die Dunkel-CO₂-Fixierung mit den Produkten Aspartat und Glutamat abgelöst. Die Vorbelichtungszeit (1 oder 5 min) hatte keinen Einfluß auf den prozentualen Anteil der einzelnen Produkte oder deren Zusammensetzung: Nach längerer Vorbelichtung nahm lediglich die Gesamtfixierungsrate zu. Bei *Chlorella* wurde ein ähnliches Muster in der prozentualen Verteilung der einzelnen Substanzen nach Vorbelichtung mit Rotlicht unter aeroben und anaeroben Bedingungen gefunden [8]. In unseren Experimenten mit *Synechococcus* fehlt allerdings die Markierung von Malat. Die starke Steigerung der Dunkel-CO₂-Fixierung nach vorangehender Photosynthese wird mit der im Licht stimulierten Aktivität der PEP-carboxylase erklärt. In Überein-

Tab. I. Einfluß der Temperatur auf das Verteilungsmuster der ¹⁴C-markierten Photosyntheseprodukte von *Synechococcus* (*Anacystis nidulans* L 1402-1). Die Anzucht erfolgte bei + 35 °C, 3,0 vol.% CO₂ und 6000 lx. Vor Versuchsbeginn wurde 1 h mit PreBluft (0,03 vol.% CO₂) begast. Die Radioaktivität ist in dpm angegeben [¹⁴C]Bicarbonatgabe nach 10 min Photosynthese.

Substanz	15 °C									
	10 sec [dpm] [%]		20 sec [dpm] [%]		40 sec [dpm] [%]		60 sec [dpm] [%]		2 min [dpm] [%]	
Aspartat	18	32,8	60	36,9	183	34,4	385	39,7	1038	41,1
3-Phosphoglycerinsäure	38	67,2	103	63,1	300	56,5	483	49,7	1125	44,6
Zuckermonophosphate	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Fructose-1.6-bisphosphat	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Phosphoenolpyruvat	—	—	—	—	49	9,2	78	8,0	263	10,4
Glycin/Serin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Alanin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Glutamat	—	—	—	—	—	—	25	2,6	98	3,9
Isoleucin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Uridindiphosphoglucose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Malat	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Gesamtfixierungsrate	56		163		531		970		2523	
Substanz	35 °C									
	10 sec [dpm] [%]		20 sec [dpm] [%]		40 sec [dpm] [%]		60 sec [dpm] [%]		2 min [dpm] [%]	
Aspartat	360	9,6	1590	12,6	4530	14,0	8235	14,7	15655	15,5
3-Phosphoglycerinsäure	2765	73,7	7630	60,5	15660	48,4	25400	45,3	33965	33,5
Zuckermonophosphate	420	11,2	2300	18,2	6495	20,1	11995	21,4	20680	20,4
Fructose-1.6-bisphosphat	—	—	—	—	330	1,0	590	1,1	1530	1,5
Phosphoenolpyruvat	205	5,5	830	6,6	2780	8,6	4140	7,4	4970	4,9
Glycin/Serin	—	—	—	—	720	2,2	950	1,7	3935	3,9
Alanin	—	—	—	—	390	1,2	835	1,5	3545	3,5
Glutamat	—	—	115	0,9	705	2,2	1925	3,4	8870	8,8
Isoleucin	—	—	—	—	—	—	—	—	1150	1,1
Uridindiphosphoglucose	—	—	—	—	—	—	970	1,7	4565	4,5
Malat	—	—	155	1,2	765	2,4	1065	1,9	2435	2,4
Gesamtfixierungsrate	3750		12620		32375		56105		101300	

stimmung mit den Befunden von Pelroy und Bassham [2], Jansz und Maclean [3] sowie Ihlenfeldt und Gibson [9] ist der Calvin-Cyclus der Hauptweg der CO₂-Fixierung im Licht. Dennoch wird ¹⁴CO₂ auch über eine lichtbetriebene PEP-Carboxylierung fixiert [4, 10], deren Anteil an der Gesamtfixierung je nach Bedingungen unterschiedlich ist.

In einer anderen Serie von Experimenten wurde der ¹⁴C-Einbau nach 10 min Vorbelichtung, also unter stationären Photosynthesebedingungen bei + 15 °C und + 35 °C untersucht (Abb. 2 und Tabelle I). Das Muster der prozentualen Verteilung in die einzelnen Substanzen während der Photosynthese-Induktion bei + 35 °C (Abb. 2 Teil A) stimmt weitgehend mit dem bei einer Versuchstemperatur von + 30 °C überein. Die ¹⁴C-Markierung von Aspartat ist am Anfang der Belichtung (hier nach 20 sec) noch höher und die von 3-Phosphoglycerin-

säure steigt zu einem Maximum an bevor parallel zum Aspartat ein Abfall im Kurvenverlauf gemessen wurde. Experimente im 2-sec-Rhythmus zeigten, daß Aspartat vor 3-Phosphoglycerinsäure ¹⁴C-markiert ist. Demnach läuft die Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat unter diesen Bedingungen (+ 35 °C) vor dem Calvin-Cyclus an und übt offensichtlich die Funktion der CO₂-Anreicherung in der Zelle über die sich anschließende Aspartat-Decarboxylierung aus. Nach 10 min Vorbelichtung – im stationären Zustand der Photosynthese – war das Muster der ¹⁴C-markierten Photosyntheseprodukte (Abb. 2 Teil B) von dem nach einer vorausgehenden längeren Dunkelperiode (30 min) völlig verschieden und zeigte sogar gewisse Ähnlichkeiten mit dem der Dunkel-CO₂-Fixierung nach Vorbelichtung. Die ¹⁴C-Markierungsrate von Aspartat stieg von einem niedrigeren Wert auf einen höheren an; der Anteil der

Radioaktivität von Phosphoenolpyruvat und Glutamat nahm ebenfalls zu. Vergleichbare Ergebnisse wurden bei einer Temperatur von + 15 °C erzielt (vgl. Tab. I). Nach kurzen Fixierungszeiten waren die Zuckermonophosphate bei dieser Temperatur nur schwach markiert (daher erfolgte keine Auswertung); ab 2 min fanden wir eine meßbare Radioaktivität. Auf Grund der wenigen radioaktiven Produkte ist der prozentuale Anteil von Aspartat relativ hoch. Der stete Abfall der Kurve für 3-Phosphoglycerinsäure und der Anstieg bei Aspartat kann als sofortiges Anlaufen des Calvin-Cyclus gewertet werden. Phosphoenolpyruvat – der Acceptor der PEP-Carboxylierung – wurde offensichtlich über 3-Phosphoglycerinsäure (dem Produkt des Calvin-Cyclus) bereitgestellt. Enzymatische Untersuchungen erga-

ben, daß *Synechococcus* eine ausreichend hohe Aktivität der PEP-carboxylase – dem Schlüssel-enzym dieser Reaktion – besitzt [4, 11]. Bei in verschiedenen Temperaturen (+ 15 °C, + 30 °C und + 35 °C) kultivierten *Synechococcus*-Zellen änderte sich das Verhältnis der PEP-carboxylase- zur RuDP-carboxylase-Aktivität. Bei + 15 °C betrug dieses 1 : 2,5, bei + 30 °C 1 : 1 und bei + 35 °C 2,5 : 1. Diese Änderungen in den Enzymdaten werden gestützt durch die Muster der ¹⁴C-markierten Substanzen bei den gleichen Temperaturen: In niedrigen Temperaturen dominiert der Calvin-Cyclus und in höherem Temperaturbereich nimmt die ¹⁴C-Markierung von Aspartat stark zu, was auf einen hohen Anteil der PEP-Carboxylierung an der Gesamt-CO₂-Fixierung zurückgeht.

- [1] E. Ohmann, In: M. Gibbs and E. Latzko (eds.), Encyclopedia of Plant Physiol. New Series, Vol. 6, Photosynthesis II, S. 54–67, 1979.
- [2] R. A. Pelroy und J. A. Bassham, Arch. Mikrobiol. **86**, 25–38 (1972).
- [3] E. R. Jansz und F. J. Maclean, Can. J. Microbiol. **19**, 497–504 (1973).
- [4] G. Döhler, Planta **118**, 259–269 (1974).
- [5] G. Döhler, Z. f. Pflanzenphysiol. **78**, 416–420 (1976).
- [6] G. Peschek, FEBS Letters **106**, 34–38 (1979).
- [7] G. Döhler, Planta **107**, 33–42 (1972).
- [8] S. Miyachi und D. Hogetsu, Can. J. Bot. **48**, 1203–1207 (1970).
- [9] M. J. A. Ihlenfeldt und J. Gibson, Arch. Microbiol. **102**, 13–21 (1975).
- [10] P. J. Weathers und M. M. Allen, Arch. Microbiol. **116**, 231–234 (1978).
- [11] B. Colman, K. H. Cheng und R. K. Ingle, Plant Science Letters **6**, 123–127 (1976).