

Die Wirkung von Makrotetralidantibiotika auf photosynthetische Reaktionen in Spinatchloroplasten

Die Verwendung von Antibiotika als Mittel zum Studium biochemischer Reaktionen und ihrer Mechanismen ist allgemein bekannt und verbreitet. Das in dieser Arbeit verwendete Dinactin gehört zur Gruppe der Makrotetralide. Diese sind niedermolekulare, zyklische Ausscheidungsstoffe von Actinomyceten von extremer Lipophilie und hoher Toxizität für Bakterien und Gewebekulturen. Ihre starke Beeinflussung der Zellaktivität wird durch ihre Eigenschaft, die Permeabilität sowohl von natürlichen wie künstlichen Membranen für Kationen zu ändern, verursacht. Makrotetralide hemmen in Mitochondrien die oxydative Phosphorylierung, die Stärke ihrer Wirkung ist ausgeprägt vom Ionenmilieu abhängig. Dies steht in Zusammenhang mit dem sehr selektiven Komplexbildungsvermögen der Makrotetralide mit Alkalimetallen und den unterschiedlichen Stabilitätskonstanten der verschiedenen Alkalimetall-Makrotetralid-Komplexe. Die grösste Stabilität weist dabei der K^+ -Makrotetralid-Komplex auf (Zusammenfassung der chemischen und biologischen Eigenschaften der Makrotetralide bei KELLER-SCHIERLEIN und GERLACH¹).

An Chloroplasten wurde bisher die Wirkung von Dinactin auf folgende lichtabhängige Reaktionen untersucht: die zyklische Phosphorylierung, die ATP-Orthophosphat-Austauschreaktion, die Hillreaktion, die lichtinduzierte Protonenaufnahme, Volumenänderungen der Chloroplasten, direkt und im Elektronenmikroskop bestimmt, und der Kaliumionenflux.

1. *Die Wirkung von Dinactin auf Phosphorylierungsreaktionen.* Bei steigender Konzentration von Dinactin erfolgt in einem K^+ -Medium eine Hemmung der zyklischen Photophosphorylierung bei $10^{-6} M$, während in einem entsprechenden Na^+ -Medium die gleiche Wirkung schon bei 10mal geringerer Konzentration zu beobachten ist. In einem in der K/Na -Zusammensetzung variierten Gemisch ist die zyklische Photophosphorylierung bei konstanter Dinactinkonzentration ($10^{-7} M$) im reinen Na^+ stark gehemmt, durch Ersetzen des Na^+ durch K^+ wird die Dinactinhemmung vollständig aufgehoben (BACHOFEN und SPECHT²). Dass es sich dabei um einen Effekt des Kaliumions handelt, ist daraus ersichtlich, dass bei konstanter Osmolarität der Dinactineffekt durch Na^+ nicht beeinflusst wird, durch eine steigende K^+ -Konzentration aber vollständig unterdrückt werden kann.

Die Austauschreaktion zwischen ATP und Orthophosphat wird allgemein als Teilschritt der ATP-Bildung sowohl bei Chloroplasten wie auch bei Mitochondrien betrachtet. Um in Chloroplasten diesen Austausch zu induzieren, müssen die Membranen zuerst in einen energiereichen Zustand gebracht werden, z. B. durch eine kurze Vollbelichtung; die Austauschreaktion selbst läuft anschliessend im Dunkeln ab (CARMELI und AVRON³). Auf die Gesamtreaktion des ATP- P_a -Austausches übt Dinactin die gleiche Wirkung aus wie auf die lichtabhängige Phosphorylierung der Chloroplasten; die genaue Analyse zeigt jedoch, dass der spezifische, kationenabhängige Einfluss der Makrotetralide nur in der Lichtphase erfolgt.

Die Wirkung von Dinactin auf die Hillreaktion (Photoreduktion von Ferricyanid mit Wasser als Elektronendonator) zeigt, dass die Makrotetralide hauptsächlich als Entkoppler wirken, wird doch eine deutliche Beschleunigung des Elektronentransportes erreicht. Auch hier ist im Bereich zwischen 10^{-8} und $10^{-6} M$ ein Unterschied zwischen Na^+ - und K^+ -Medium messbar, der entsprechend den Resultaten der Phosphorylierung ist (BACHOFEN und SPECHT²).

2. *Die Wirkung von Dinactin auf die lichtinduzierte Protonenaufnahme.* Bei Belichtung ungepufferter Chloroplastensuspensionen kann im Außenmedium eine Abnahme der Protonenkonzentration gemessen werden, die im Dunkeln vollständig reversibel ist (NEUMANN und JAGENDORF⁴). Dinactin reduziert diese lichtinduzierte Protonenwanderung in ähnlichen Konzentrationen wie die Phosphorylierung, wobei weniger eine Änderung der Anfangsgeschwindigkeit des Protonentransportes als eine Reduktion des Gesamtausschlages zu beobachten ist. Auch für diese Reaktion ist die Zusammensetzung des Reaktionsmediums entscheidend: Im Gegensatz zur ATP-Bildung ist jedoch die Grösse des messbaren Protonengradienten in K^+ stärker beeinflusst als in Na^+ .

¹ W. KELLER-SCHIERLEIN und H. GERLACH, Fortschr. Chem. org. Natstoffe 26, 161 (1968).

² R. BACHOFEN und I. SPECHT-JÜRGENSEN, Planta 90, 66 (1970).

³ C. CARMELI und M. AVRON, Biochem. Biophys. Res. Comm. 24, 923 (1966).

⁴ J. NEUMANN und A. JAGENDORF, Arch. Biochem. 107, 109 (1964).

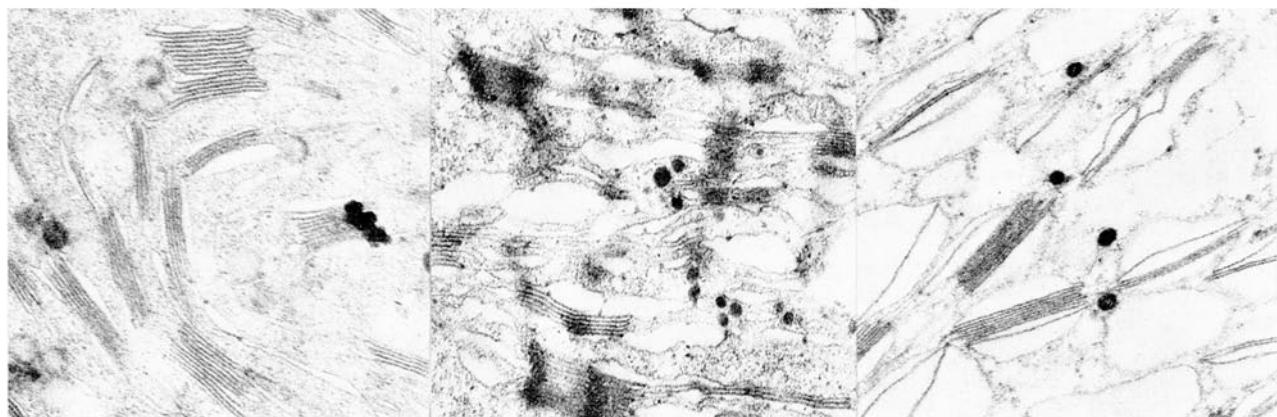


Fig. 1. Elektronenmikroskopische Aufnahme der Grana- und Stromastruktur von Chloroplasten nach Dinactineinwirkung. Vergrösserung 30000fach. a) Kontrolle, b) 1 min nach Zugabe von Dinactin (Endkonzentration $10^{-4} M$), c) 10 min nach Zugabe von Dinactin, belichtet. Siehe auch Erklärungen im Text.

Zusammengefasst zeigt sich, dass in Gegenwart von Dinactin und K^+ die Phosphorylierung wenig beeinflusst ist, der Protonengradient aber gleichzeitig reduziert wird; in Na^+ dagegen erreicht der letztere nahezu die Kontrollwerte, die Phosphorylierung dagegen ist bei gleicher Hemmstoffkonzentration blockiert.

3. Die Wirkung von Dinactin auf das Volumen der Chloroplasten. Agentien, welche die Permeabilität von Membranen beeinflussen, müssen auch Auswirkungen auf das Volumen der entsprechenden Partikel zeigen. Zugabe von Dinactin in Gegenwart von K^+ lässt die Chloroplasten sehr rasch das Volumen vergrößern; es kann angenommen werden, dass als Folge der Dinactinzugabe K^+ bis zum Gleichgewichtszustand relativ ungehindert eintritt, parallel dazu erfolgt eine Wasseraufnahme, welche die Volumenvergrößerung bewirkt. In Na^+ erfolgen die gleichen Reaktionen wie in K^+ , sie sind aber wegen der geringeren Spezifität des Dinactins für Na^+ langsamer und von kleinerem Umfang. Bei Belichtung erfolgt ein Schrumpfen der Zellorganellen, interpretierbar als licht- (oder energie-) getriebener Ionen-Ausfluss. Dabei kann ATP in diesem Prozess die Lichtwirkung weitgehend ersetzen (BOSCHARD und BACHOFEN⁵).

Volumenänderungen in der beschriebenen Grösse sollten im Elektronenmikroskop als Änderung der Ultrastruktur sichtbar sein, außerdem müsste dadurch entschieden werden können, ob an der Schwelling der Chloroplasten hauptsächlich der Stromaraum – durch erhöhte Permeation durch die Chloroplastenmembran – oder auch der Innengranaraum – durch Quellung der Thylakoide selbst – beteiligt sind. Ausschnitte aus entsprechend behandelten Proben ganzer Chloroplasten zeigen die Dinactinwirkung auch in der elektronenoptisch sichtbaren Ultrastruktur (Figur 1). Man beachte in Figur 1b die gegenüber 1a vergrösserte Zahl optisch leer erscheinender «Stromavakuolen» und den leicht vergrösserten Abstand der Granalamellen. Nach Belichtung in 1c sind die Granalamellen enger gepackt, die «Stromavakuolen» haben sich unter dem Einfluss von Dinactin weiter vergrößert. Das Ausmessen der Bilder bestätigt, dass wie bei den zuerst genannten Volumenmessungen die ganzen Chloroplasten z.B. 1 min nach der Dinactinbehandlung linear im Mittel um 25%, die Thylakoidstapel um 35% zugenommen haben, also sowohl die Permeabilität für K^+ der Chloroplastenmembran als auch der Thylakoide selbst erhöht wird.

4. Die Wirkung von Dinactin auf den K^+ -Gehalt der Chloroplasten. Chloroplasten von Spinat enthalten um 400 μg K^+ /mg Chlorophyll; mit raschen Präparationsmethoden (z.B. NOBEL⁶) bleibt, wie sich aus dem Vergleich mit nichtwässrigen Präparationen ergibt, das endogene K^+ vollständig in den Chloroplasten, während bei den älteren, wässrigeren Aufarbeitungsmethoden (z.B. WHATLEY und ARNON⁷) oft mehr als 50% des Alkalimetall ausgewaschen wird. Dem oben erwähnten reversiblen Schrumpfen und Schwellen bei Wechsel von Licht und Dunkel läuft eine entsprechende Bewegung von K^+ -Ionen parallel; Verschiebungen der Ladungen durch den eingangs erwähnten lichtinduzierten Protonentransport werden damit durch den entgegengesetzt fliessenden K^+ -Ionentransport mindestens zum Teil neutralisiert (Figur 2). Bei Behandlung von Chloroplasten mit Dinactin kann im Dunkeln eine deutlich raschere Äquilibrierung zwischen dem K^+ aussen (^{42}K) und dem K^+ innen beobachtet werden. Wird die Präparation schliesslich belichtet, so nehmen das Volumen der Chloroplasten und die ^{42}K -Aktivität der letzteren parallel ab, eine Beobachtung, die nach den bisherigen Untersuchungen als energieabhängiges Auspumpen des K^+ betrachtet werden kann (Figur 3). Werden Volumenänderungen und Trans-

port von K^+ zusammenfassend betrachtet, zeigt sich, dass sowohl in Abwesenheit wie in Gegenwart von Dinactin die beiden Vorgänge bei Belichtung und Abdunklung einen parallelen Verlauf zeigen, wobei angenommen werden darf, dass der K^+ -Transport von den beiden die primäre Reaktion darstellt.

5. Diskussion. Die Absorption der Lichtenergie durch die Chloroplastenpigmente erzeugt in der photosynthetisch aktiven Membran eine Potentialdifferenz, durch welche von den bisher erwähnten Reaktionen vermutlich primär die Protonen von aussen nach innen verschoben werden. Der entstandene Protonengradient in der Membran kann nach MITCHELL⁸ für die ATP-Synthese ausgenutzt werden, beim Protonenrückfluss wird über eine gekoppelte reversible ATPase aus ADP und Phosphat ATP gebildet. Zugabe von Dinactin erhöht die K^+ -Permeabilität der Chloroplastenmembran weitgehend und

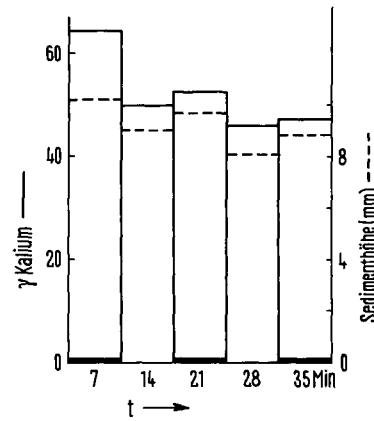


Fig. 2. Parallelität zwischen Volumen ganzer Chloroplasten (Sedimenthöhe nach Hämatokritzentrifugation) und K^+ -Gehalt der Chloroplasten (gemessen mit Atomabsorption, $\mu\text{g } K^+/\text{mg Chlorophyll}$) bei Wechsel von Licht und Dunkel. Zeitangabe auf der Abszisse, ausgefüllter Balken = dunkel.

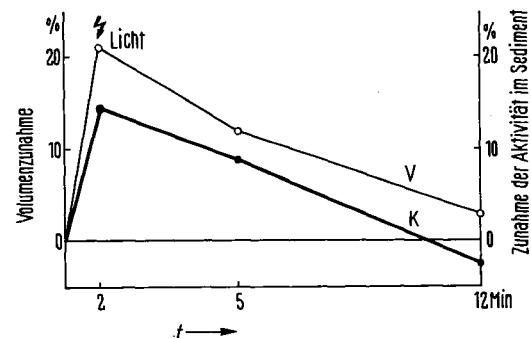


Fig. 3. Parallelität zwischen Volumen ganzer Chloroplasten (Hämatokritzentrifugation) und Gehalt an ^{42}K (nach Vorinkubation mit ^{42}KCl während 15 min) bei Belichtung nach Zugabe von Dinactin (Endkonzentration $10^{-4} M$). Beginn der Belichtung nach 2 min (Pfeil); alle Werte angegeben in % über dem Kontrollwert ohne Dinactin zur Zeit 0. V = Volumen; K = Gehalt an ^{42}K .

⁵ E. BOSSHARD-HEER und R. BACHOFEN, Planta 91, 204 (1970).

⁶ P. S. NOBEL, Pl. Physiol. 42, 1389 (1967).

⁷ F. R. WHATLEY und D. I. ARNON, in *Methods in Enzymology* (Eds. S. P. COLOWICK und N. O. KAPLAN; Academic Press, New York 1963), Vol. 6, p. 308.

⁸ P. MITCHELL, Biol. Rev. 41, 445 (1966).

beeinflusst damit nicht nur den Transport von K^+ selbst, sondern auch indirekt die damit gekoppelten Reaktionen, den Protonentransport und die Phosphorylierung im Licht. Durch Erhöhung des passiven K^+ -Einstromes in Gegenwart von Dinactin muss wie beschrieben bei obligater Kopplung des Protonenfluxes zum K^+ -Efflux und der Phosphorylierung zum ersten in Anwesenheit bestimmter Konzentrationen von Dinactin eine Stimulation der Phosphorylierung durch K^+ , gleichzeitig aber auch eine Reduktion des messbaren Protonenfluxes durch die Verringerung des Ladungsgradienten sichtbar werden. Die Beeinflussung der untersuchten photosynthetischen Reaktionen wäre dann auf eine Verschiebung der K^+ -Konzentration innerhalb bzw. außerhalb der Chloroplasten zurückgeführt. Anderseits ist auch eine direkte Einwirkung auf den lichtabhängigen Ionentransport selbst denkbar. Noch liegen heute keine Untersuchungen vor, die eindeutig nachweisen, über welche Mechanismen die einzelnen Reaktionen sich gegenseitig beeinflussen (vgl. auch GREVILLE⁹).

Summary. The macrotetradiid antibiotic Dinactin uncouples phosphorylation from electron transport in illuminated chloroplasts in the presence of Na^+ at lower concentrations than in K^+ , while the light-induced proton uptake is more inhibited in a medium with K^+ than with Na^+ . The large volume changes of whole chloroplasts in the light and after addition of Dinactin are parallel to the amount of K^+ in the chloroplasts.

R. BACHOFEN¹⁰

Institut für Allgemeine Botanik der Universität,
CH-8006 Zürich (Schweiz), 14. Dezember 1970.

⁹ G. D. GREVILLE, in *Current Topics in Bioenergetics* (Ed. D. R. SANADI; Academic Press, New York 1969), p. 1.

¹⁰ Die Resultate der vorliegenden Arbeit entstanden zusammen mit ELISABETH BOSSHARD-HEER, H. R. HOHL, CH. PFLUGSHAUPT und INGRID SPECHT-JÜRGENSEN. Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds für die grosszügige Unterstützung.

Continuous Nucleolar DNA Synthesis after Inhibition of Mitosis in *Physarum polycephalum*¹

Nuclear DNA synthesis in *P. polycephalum* follows immediately upon mitosis. In most nuclei the replication of the extranucleolar DNA is completed within the first 3 h of the intermitotic period (²⁻⁴), whereas replication of the nucleolus-associated DNA, as determined by exposure to short pulses of thymidine-³H, occurs throughout the remaining approximately 6–7 h preceding the next mitosis⁵. The results described in the following lend support to the hypothesis that the replication of nucleolus-associated DNA is a continuous process which may go beyond the level of duplication during the intermitotic period⁶.

Material and methods. Culture methods and experimental procedure. The organism was grown in the form of microplasmodia in agitated culture⁷. Mitotically synchronized surface plasmodia were prepared as described previously⁸. At a stage just prior to or during the time at which the previously central nucleolus gradually begins to move toward the nuclear membrane in preparation for mitosis (henceforth referred to as the 'acentric stage'), plasmodia were covered with a circular piece of wet filter paper of approximately the same size and shape as the plasmodia. This caused the plasmodia to spread from underneath the filter paper. If the beginning of mitosis was imminent at that time, a phase difference with regard to the time of mitosis developed between the nuclei in the peripheral areas of the plasmodia which had spread from under the filter paper and those in the covered parts of the plasmodia. In the free areas of the plasmodia the nuclei advanced with almost no delay toward, or through, mitosis, whereas mitosis was delayed in the covered areas. While the plasmodia continued to spread, the nuclei from the covered areas were carried, by protoplasmic streaming, into the more advanced, peripheral areas. As a result, the peripheral, postmitotic regions contained a few nuclei which were either in the acentric stage or in early prophase⁹. The number of these nuclei in the postmitotic regions was kept small by excising the central, covered, parts as soon as a few, either acentric or early-prophase nuclei were found among the postmitotic nuclei in smear preparations.

Cytological methods. For determination of mitotic stages¹⁰, ethanol-fixed smear preparations from small

explants of the plasmodial periphery were inspected under phase contrast¹⁰. For autoradiography, plasmodial pieces containing a small number of either acentric or early-prophase nuclei were incubated for periods of 30 min at different times during the S period following mitosis, with 50 μ C/ml of thymidine-³H from Schwarz BioResearch, Inc., Orangeburg, New York, specific activity 11.0 c/mole. Squash preparations¹¹ were processed for autoradiography⁵. The preparations were incubated in metal desiccators, under nitrogen atmosphere, for periods of up to 5 months. Control slides were treated with DNase⁵ prior to autoradiography.

Results. Both acentric and early-prophase nuclei retained their morphological appearance for several hours before they gradually assumed the morphological appearance of interphase nuclei. Figure 1 shows a representative autoradiograph of an acentric nucleus in an S-phase environment, from a plasmodium which was incubated with thymidine-³H for 30 min, beginning approximately 2.5 h after metaphase of the advanced nuclei. In the acentric nucleus only the nucleolus-associated DNA is labelled. Figure 2 shows an autoradiograph of an early-prophase nucleus surrounded by heavily labelled postmitotic (=S phase) nuclei. This plasmodium was incubated

¹ This investigation was supported in part by PHS Research Grant No. GM 18221.

² O. F. NYGAARD, S. GUTTES and H. P. RUSCH, *Biochim. biophys. Acta* 38, 298 (1960).

³ R. BRAUN, C. MITTERMAYER and H. P. RUSCH, *Proc. natn. Acad. Sci., USA* 53, 924 (1965).

⁴ S. GUTTES and E. GUTTES, *J. Cell Biol.* 37, 761 (1968).

⁵ E. GUTTES and S. GUTTES, *J. Cell Biol.* 43, 229 (1969).

⁶ E. GUTTES and M. M. KLEBA, *J. Cell Biol.* 47, 80a (1970).

⁷ J. W. DANIEL and H. H. BALDWIN, in *Methods in Cell Physiology* (Ed. D. M. PRESCOTT; Academic Press, New York 1964), vol. 1, p. 9.

⁸ E. GUTTES and S. GUTTES, in *Methods in Cell Physiology* (Ed. D. M. PRESCOTT; Academic Press, New York 1964), vol. 1, p. 43.

⁹ V. R. DEVI, E. GUTTES and S. GUTTES, *Expl Cell Res.* 50, 589 (1968).

¹⁰ E. GUTTES, S. GUTTES and H. P. RUSCH, *Devl Biol.* 3, 588 (1961).

¹¹ E. GUTTES, P. C. HANAWALT and S. GUTTES, *Biochim. biophys. Acta* 142, 181 (1967).