

Hemmung der aktiven Bromidaufnahme durch Pflanzenzellen durch Glucose

Von

H. Paschinger und E. Broda*

Aus dem Institut für Physikalische Chemie der Universität Wien

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 15. März 1967)

Die Aufnahme von Bromid-Ion durch *Chlorella pyrenoidosa*, die durch aktiven Transport erfolgt, wird durch Glucose gehemmt, obwohl die Atmung stimuliert wird. Die Hemmung tritt bei Energielieferung durch Belüftung oder Belichtung ein. Galactose und Mannit wirken nicht wie Glucose. Offenbar hemmt die Glucose die Nutzbarmachung des Elektronenflusses bei dem System der Atmung oder Photophosphorylierung für die Bromid-Aufnahme.

The absorption of bromide ion by *Chlorella pyrenoidosa*, which is due to active transport, is inhibited by glucose though respiration is stimulated. Inhibition is observed when energy is supplied either by aeration or by illumination. Galactose or mannitol do not act like glucose. Apparently glucose interferes with the utilization of electron flow in the respiration or photophosphorylation systems for the absorption of bromide.

Es ist bekannt, daß Bromid-Ionen ebenso wie Chlorid-Ionen durch einen unmittelbar stoffwechselabhängigen Prozeß „aktiv“ in Pflanzenzellen aufgenommen und durch sie angereichert werden^{1, 2}. Man nimmt an, daß das Bromid in den Zellen als freies Ion vorliegt. Der Aufnahme-mechanismus für Bromid ist weitgehend für dieses Element spezifisch, d. h. selbst ein großer Überschuß an nicht-radioaktiven Fremd-Anionen — außer Chlorid^{3, 4} — vermindert die Geschwindigkeit der Aufnahme

* Herrn Prof. Dr. F. Wessely zum 70. Geburtstag in Verehrung gewidmet.

¹ J. F. Sutcliffe, J. Exper. Bot. **5**, 313 (1954).

² L. Ordín und L. Jacobson, Plant Physiol. **30**, 21 (1955).

³ E. Epstein, Nature [London] **171**, 83 (1955).

⁴ O. E. Elzam und E. Epstein, Plant Physiol. **40**, 620 (1965).

radioaktiven Bromids durch Pflanzenzellen nicht. Durch Entzug von Energie, etwa durch gleichzeitigen Ausschluß von Licht und Sauerstoff, wird die Aufnahme des Bromids fast vollständig unterdrückt. Auch abgetötete Algen nehmen kein Bromid mehr auf. Wir haben nun bei Versuchen über den Einfluß der Energieversorgung auf die Bromid-Aufnahme durch Chlorella-Algen gefunden, daß Glucose eine stark hemmende Wirkung auf die Bromid-Aufnahme ausübt, obwohl sie doch als zusätzliches energielieferndes Substrat wirken könnte.

Material und Methoden

Es wurde autotroph oder heterotroph gezüchtete Chlorella pyrenoidosa verwendet, d. h. als Kohlenstoffquelle der Algen, die in Mineralsalzlösung gezüchtet wurden, diente CO₂ bzw. Glucose. Die Algen wurden durch Abnutschen der Nährlösung und Waschen mit destill. Wasser geerntet⁵.

Die Aufnahme des Radiobromids (⁸²Br, Halbwertszeit 35,8 Std., bezogen aus dem Reaktorzentrum Seibersdorf) wurde bestimmt, indem die Suspension der Algen unter Durchleiten eines Gasstroms (Luft oder Stickstoff) mit annähernd neutraler, ungepufferter Bromidlösung behandelt wurde und nach verschiedenen Zeiten jeweils ein Teil der Algensuspension zentrifugiert wurde. Die Radioaktivität der ursprünglichen Lösung und des verbleibenden Überstandes wurde mit einem γ -Szintillationszähler gemessen; aus der Differenz wurde die aufgenommene Menge berechnet.

Die Atmung der Algen wurde im Warburg-Apparat der Type VL 85 (B. Braun Apparatebau, Melsungen) gemessen. Es wurde jeweils der Sauerstoffverbrauch von 150 mg Algen je 20 Min. bestimmt. (Alle Angaben von Algenengewichten beziehen sich auf feuchte Algen mit etwa ein Drittel Trockensubstanz.) Bei Versuchen über die Aufnahme der Glucose durch die Algen (ohne Belichtung) wurde die verbleibende Glucose durch Kolorimetrie des Überstandes nach der Anthronmethode⁶ ermittelt.

Ergebnisse

Die Spezifität der Bromid-Aufnahme durch Chlorella zeigt Abb. 1. Der Abb. 2 entnimmt man die Abhängigkeit der Bromid-Aufnahme von der Konzentration der Glucose. Um die Möglichkeit eines osmotischen Effekts auszuschalten, wurden auch Versuche mit Mannit und Galaktose in gleicher Konzentration angestellt; die Effekte waren nicht nennenswert (Abb. 3).

Die Hemmung der Bromid-Aufnahme durch Glucose ist noch stärker ausgeprägt, wenn die Algen mit Glucose 2 Stunden vor dem Bromidzusatz

⁵ H. Paschinger, Dissertation (Universität Wien), in Vorbereitung.

⁶ S. Seiffter, S. Dayton, B. Nivic und E. Muntevyler, Arch. Biochem. **25**, 191 (1950).

vorinkubiert werden⁵. Wenn umgekehrt Glucose erst nach dem Bromid zugefügt wird, tritt bereits aufgenommenes Bromid aus den Algen wieder aus⁵.

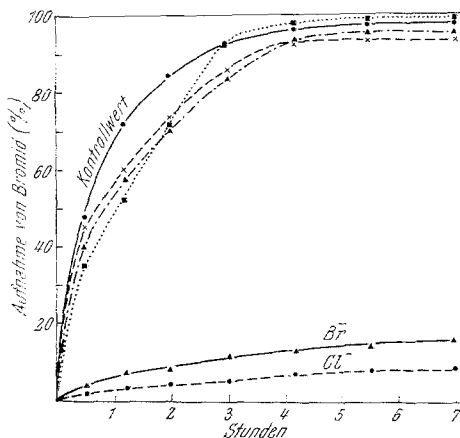


Abb. 1.

Abb. 1. Aufnahme von markiertem Br (10^{-6} m) bei einem 200-fachen Überschuß an unmarkierten Anionen (als Kaliumsalze). Heterotrophe Algen (20 mg/ml), bei Belüftung und ohne Belichtung. ($\text{NO}_3^- \cdots \blacksquare \cdots \blacksquare \cdots$, $\text{SO}_4^{2-} \times \cdots \times \cdots$, $\text{J}^- \blacktriangle \cdots \blacktriangle \cdots$, $\text{Br}^- \blacktriangle \cdots \blacktriangle \cdots$, $\text{Cl}^- \bullet \cdots \bullet \cdots$)

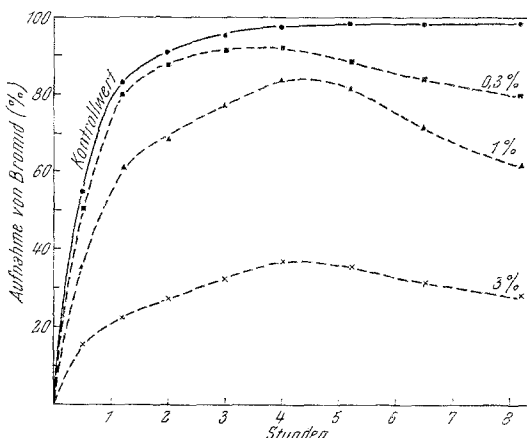


Abb. 2.

Abb. 2. Aufnahme von markiertem Br ($4 \cdot 10^{-6}$ m) in Gegenwart von 0,3, 1 und 3 % Glucose. Heterotrophe Algen (20 mg/ml), bei Belüftung und ohne Belichtung

Die Hemmung der Bromid-Aufnahme durch Glucose ist von der Art der Energiequelle nicht abhängig, d. h. sie tritt nicht nur bei gleichzeitiger Belichtung und Belüftung der Algen, sondern auch bei Belichtung unter

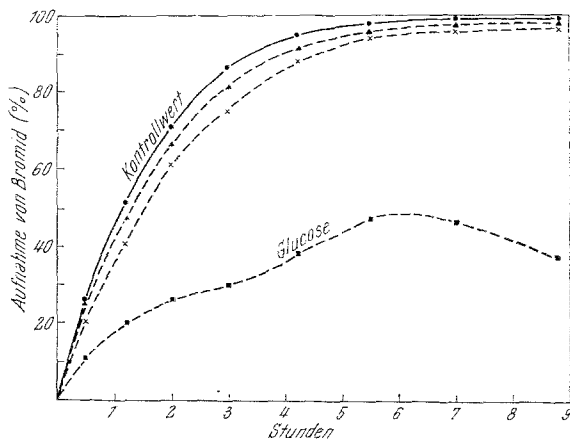


Abb. 3. Aufnahme von markiertem Br (10^{-6} m) in Gegenwart von 3 % Mannit ($-\blacktriangle-\cdots-\blacktriangle-$), 3 % Galactose ($-\times-\cdots-\times-$) oder 3 % Glucose ($-\blacksquare-\cdots-\blacksquare-$). Heterotrophe Algen (20 mg/ml), bei Belüftung und ohne Belichtung

Stickstoff und bei Belüftung im Dunkeln auf⁵. Der Effekt ist auch nicht auf eine etwaige pH-Verschiebung zurückzuführen. Diese war stets gering, und die Glucose ist sogar bei Pufferung der Lösung auf pH 7,2 mit Phosphat wirksam.

In bezug auf (markiertes) Phosphat wurde keine Hemmung der Aufnahme durch Glucose (2%) beobachtet⁵. Die Aufnahme von markiertem Rubidium — das sich hinsichtlich der Aufnahme durch Pflanzenzellen annähernd wie ein Isotop des Kaliums verhält — wurde durch Glucose (1%) sogar gesteigert⁵.

Die Geschwindigkeit der Aufnahme von Glucose durch (heterotrophe) Algen erreichte bei einer Konzentration von 0,1% bereits den Sättigungswert, und zwar werden im Sättigungsbereich 5—6 mg Glucose je g Algen und Stunde aufgenommen. Daher vermindert sich z. B. die Konzentration einer 1proz. Glucoselösung während einer Versuchsdauer von 9 Stunden (Abb. 2) nur um 10%.

Die endogene Atmung der (heterotrophen) Algen betrug rund 2,2 ml O₂ je g Algen und Stunde. Bei Zusatz von Glucose im Bereich 0,01—3% wurde eine Vermehrung der Atmung beobachtet, die mit der Glucosekonzentration anstieg, und bei 0,3% einen Sättigungswert (etwa beim Doppelten der endogenen Atmung) erreichte. Allerdings war die Steigerung nur bei Konzentrationen von mindestens 0,3% dauernd, während die Atmung bei kleineren Konzentrationen innerhalb einer Stunde wieder auf den Ausgangswert abfiel.

Diskussion

Durch die Messungen der Aktivität wird natürlich nur die Differenz zwischen dem (aktiven) Eintritt und dem Austritt (vermutlich durch „passive“ Diffusion) erfaßt. Das Auftreten von Maxima der Aufnahme in Gegenwart von Glucose (Abb. 2 und 3) nach einer gewissen Zeit weist darauf hin, daß die Hemmung durch Glucose erst allmählich wirksam wird.

Glucose wird durch Pflanzenzellen besser aufgenommen als Galactose⁷⁻⁹. Die Aufnahme wird durch Licht angetrieben^{10, 11} und ein aktiver Aufnahme-Mechanismus wird angenommen¹². Die vorliegenden Versuche zeigen im Einklang mit früheren¹³, daß die Glucose die Atmung der

⁷ F. J. Taylor, Proc. Roy. Soc. **B 151**, 400 und 483 (1960).

⁸ W. Hülsen und U. Prenzel, Z. Naturforsch. **21b**, 500 (1966).

⁹ M. Rodriguez-Lopez, J. Gen. Microbiol. **43**, 139 (1966).

¹⁰ O. Kandler, W. Tanner und L. Dächsel, Plant Physiol. **40**, 1151 (1965).

¹¹ V. S. Butt und M. Peel, Biochem. J. **88**, 31 P (1966).

¹² B. R. Grant und H. Beevers, Plant Physiol. **39**, 78 (1964).

¹³ J. Myers, J. Gen. Physiol. **30**, 217 (1947).

Chlorella stimuliert; vermutlich wird ein Teil der aufgenommenen Glucose veratmet, während der Rest in Polysaccharide eingebaut wird.

Ein Crabtree-Effekt (Hemmung der Atmung durch Glucose), wie er bei tierischen Zellen beobachtet wird^{14, 15}, liegt also nicht vor. Es muß daher angenommen werden, daß die Versorgung der Zellen mit Adenosin-triphosphat (ATP) durch die Glucose verbessert wird. Dazu stimmt, daß wir beim Phosphat, dessen Assimilation unter ATP-Verbrauch erfolgt, keine Glucosehemmung beobachten. Übrigens zeigt das Ausbleiben der Hemmung auch, daß der Verbrauch von ATP für die Hexokinase-reaktion der Glucose keinen Mangel an ATP für den aktiven Transport des Phosphats bewirkt. Die Steigerung der ATP-abhängigen Rubidium-Aufnahme durch Glucose läßt ebenfalls einen erhöhten ATP-Spiegel in den Algen vermuten.

Unter diesen Umständen ist überraschend, daß eine andere Leistung, für die Energie benötigt wird (aktiver Transport des Bromids), durch Glucose gehemmt wird. Zur Aufklärung muß man vom spezifischen Mechanismus der Aufnahme von Bromid durch Pflanzenzellen ausgehen. Nach allen vorliegenden Versuchen, auch anderer Autoren, wirkt der gleiche Mechanismus auf Bromid und Chlorid, so daß mit Chlorid erhaltene Ergebnisse zur Deutung herangezogen werden dürfen.

*MacRobbie*¹⁶ hat Beweise dafür gefunden, daß die Energie für die aktive Aufnahme von Chlorid durch Algenzellen (in diesem Fall: *Nitella translucens*) im Gegensatz zu der Aufnahme mehrerer anderer Ionenarten nicht aus ATP stammt, sondern daß die Energie unmittelbar durch den Elektronenfluß bei der nicht-zyklischen Photophosphorylierung geliefert wird. Daher findet auch eine aktive Aufnahme unter Bedingungen, wo nicht-zyklische Photophosphorylierung unterdrückt ist und bloß zyklische Photophosphorylierung auftritt, nicht statt. Damit steht das Chlorid-Ion im Gegensatz zu Kalium¹⁶ und Orthophosphat¹⁷.

Da der aktive Transport des Bromids auch dann beobachtet wird, wenn Energie nur durch Atmung geliefert wird (Algen im Dunkeln unter Luft) und auch unter dieser Bedingung die für den Br-Transport benötigte Energie nicht aus ATP stammt⁵, ist zu schließen, daß auch der Elektronenfluß bei der Atmungskette im Sinne der Vorstellungen von *Robertson*¹⁸ für den aktiven Br-Transport nutzbar gemacht werden

¹⁴ Siehe *A. C. Aisenberg*, *The Glycolysis and Respiration of Tumors*, New York 1961.

¹⁵ *W. Rücker, E. Broda, G. Kellner und J. Frimmel*, *Exper. Cell Res.* **29**, 17 (1963) (Tierische Zellen in Kultur).

¹⁶ *E. A. C. MacRobbie*, *Biochem. Biophys. Acta* **94**, 64 (1966).

¹⁷ *F. A. Smith*, *Biochim. Biophys. Acta* **126**, 94 (1966).

¹⁸ Siehe *G. E. Briggs, A. B. Hope und R. N. Robertson*, *Electrolytes and Plant Cells*, Oxford 1961, S. 152.

kann. Damit stimmt gut überein, daß der Glucoseeffekt auch bei der Atmung auftritt.

Für die Deutung des Glucoseeffektes beim Bromid muß demnach angenommen werden, daß die Glucose die Nutzbarmachung des Elektronenflusses sowohl der Atmungskette als auch des Photophosphorylierungssystems für den aktiven Transport des Bromids behindert.

Wir danken dem Bundesministerium für Verkehr und verstaatlichte Unternehmungen der Republik Österreich für finanzielle Unterstützung.