

Selektive Wirkungen von Lindan (γ -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan) auf Photosynthese, Aminosäure — Membrantransport und Proteinsynthese bei *Anacystis nidulans*

Selective Effects of Lindane (γ -1,2,3,4,5,6 Hexachlorocyclohexane) on Photosynthesis, Membrane Transport of Amino Acids and Protein Synthesis in *Anacystis nidulans*

Wilhelm Simonis und Johanna Lee-Kaden

Universität Würzburg, Lehrstuhl Botanik I, Mittlerer Dallenbergweg 64, D-8700 Würzburg

Z. Naturforsch. 34 c, 1062 — 1065 (1979); eingegangen am 12. Juni 1979

Anacystis nidulans, Lindane Effects, Amino Acids, Membrane Transport, Photosynthesis

Effects of the chlorinated hydrocarbon insecticide Lindane on membrane transport of two neutrale amino acids in the Cyanobacterium *Anacystis nidulans* (*Synechococcus AN*) were measured. In white light the L-Leucine incorporation into the protein fraction was inhibited, increasing with time. After 30 minutes the degree of inhibition was the same as the effect of DCMU (5×10^{-6} M) on L-Leucine incorporation. $^{14}\text{CO}_2$ -fixation was also reduced at this time. At 717 nm, which enables PS I activity alone, no inhibition was observed. The light energy dependent membrane transport itself of L-leucine in presence of CAM and of the non-metabolisable α -AIB in white light and in monochromatic light of 630 nm and of 717 nm were not influenced by Lindane. The different sites of Lindane action are discussed. It is assumed that in 30 minutes chiefly photosynthesis (PS II and CO_2 -fixation) is affected by Lindane, resulting in a suppression of protein synthesis caused by a depletion of intermediates of CO_2 -fixation.

Durch Oberflächenwasser und Abwasser gelangen persistente, chlorierte Kohlenwasserstoffe, wie DDT oder Lindan (γ -Hexachlorcyclohexan) [1] in Gewässersysteme aller Art und können auf Mikroalgen im Wasser unbeabsichtigte Wirkungen ausüben. Bei einmaliger Zugabe von Lindan beginnend mit $3,4 \times 10^{-6}$ M wurde eine Beeinflussung von Chlorophyllsynthese, Wachstum, Teilung und Photosynthese beobachtet [2]. Über die Wirkorte des lipophilen Lindan liegen erst wenige Untersuchungen vor. Auf Grund von Erfahrungen an Insekten und künstlichen Membranen werden Wirkungen auf Biomembranen vermutet [3]. Versuche von Borghi und Mitarb. [4] an *Acetabularia* ergaben eine Hemmung der Proteinsynthese, gemessen an der Einlagerung von markiertem Leucin, die als Hemmung der Leucinaufnahme und damit als Membranwirkung erklärt wurde. Wild und Mitarb. [5] fanden eine Beeinflussung der Hill-Reaktion bei isolierten Chlорoplasten und wir selbst konnten kürzlich zeigen,

dass Lindan Änderungen des Membranpotentials und des Membranwiderstandes unter passiven Fluxbedingungen hervorruft [6, 7]. In der vorliegenden Arbeit wird über Lindanwirkungen auf den Membrantransport und die Inkorporation von 2 Aminosäuren, L-Leucin und die nicht metabolisierbare α -Aminoisobuttersäure (α -AIB) bei dem Cyanobakterium *Anacystis nidulans* (*Synechococcus AN*) im Zusammenhang mit einer Beeinflussung der Photosynthese berichtet.

Material und Methoden

Anacystis nidulans (Richt.) Dr. Stamm 1402-1 der Göttinger Algenkultursammlung, neuerdings als *Synechococcus AN* [8] bezeichnet, wurde, wie früher beschrieben [9], kultiviert. Das Versuchsmedium (4 ml) der in Warburg-Reaktionsgefäß mit 2 Ansatzbirnen durchgeführten Versuche enthielt 2,0 ml Algen der optischen Dichte $D_{630} = 2,0$; 1,1 ml MES-Puffer (36 mM); 0,2 ml unmarkierter Aminosäure, α -AIB oder L-Leucin (10 μM); 0,01 ml Methanol (Endkonzentration 0,25%) oder in Methanol gelöstes Lindan (Endkonzentration $8,6 \times 10^{-5}$ M) und gegebenenfalls eine gewünschte Konzentration eines weiteren Inhibitors; ferner 0,2 ml an L-[1- ^{14}C]Leucin (0,2 μCi) oder 0,2 ml [^{14}C] α -AIB (0,2 μCi). Die Versuchstemperatur betrug 38 °C, pH = 6,0. Die

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. W. Simonis.

Abkürzungen: α -AIB, α -Aminoisobuttersäure; CAM, Chloramphenicol; CCCP, Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazone; DBMIB, 2,5-Dibrom-Methyl-6-isopropyl-p-benzochinon; DCMU, 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylharnstoff; PS I, II, Photosystem I, II; TCE, Trichloressigsäure.

0340-4811 / 79 / 0900-1062 \$ 01.00/0.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Versuche im Weißlicht (10×10^3 lx) wurden im Warburgapparat (Braun-Melsungen) durchgeführt. Die Bedingungen der Belichtung mit quantengleichem monochromatischem Licht von 630 bzw. 717 nm, die Aufarbeitung der Versuche und die Messungen der Radioaktivität entsprachen den früher beschriebenen Versuchen [9]. Die $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung wurde entsprechend den Angaben bei Bornefeld und Simonis [10] und die O_2 -Produktion in üblicher Weise kontinuierlich mit der Warburg-Methode bei pH 8 bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Zur Untersuchung der Wirkung von Lindan auf membranabhängige Prozesse verwendeten wir das nach der bisherigen Nomenklatur zu den Blaualgen zu rechnende photosynthetisch aktive Cyanobakterium *Anacystis nidulans*, das weder eine Tonoplastenmembran noch eine Chloroplastenhülle besitzt. Es ist deshalb nur mit der Cytoplasmamembran und den davon gesonderten Thylakoidmembranen zu rechnen. Auf den letzteren sind sowohl die Elektronentransportketten der Photosynthese als auch die der Atmung angeordnet [8]. *Anacystis nidulans* kann L-Leucin (1×10^{-5} M) über längere Zeit hinweg aufnehmen. Die Aufnahme ist lichtabhängig, sie kann aber auch im Dunkeln erfolgen [9]. Selbst im monochromatischen dunkelroten Licht (717 nm) wird, abhängig von der Lichtintensität, sowohl bei Belüftung als auch in Stickstoffatmosphäre Leucin aufgenommen. Die energiebedürftige Aufnahme kann demnach durch Photosystem I (PS I) betrieben werden. Sie wird durch Inhibitoren wie DBMIB unterdrückt. Auch Entkoppler bzw. Protonengradienten erniedrigende Substanzen (CCCP) sind wirksam. Die nähere Untersuchung zeigt [9], daß aufgenommenes markiertes L-Leucin sehr rasch zu einem erheblichen Anteil (etwa 80%) in die Proteinfaktion (TCE-unlösliche Fraktion) eingebaut wird, denn der Einbau wird durch Chloramphenicol (CAM, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) fast völlig gehemmt. Bei den folgenden Versuchen zur Lindanwirkung muß deshalb die Leucinaufnahme und die anschließende Metabolisierung (Inkorporation) unterschieden werden.

Wurde im Licht (Weißlicht) Lindan zum Zeitpunkt 0 min gleichzeitig mit ^{14}C -markiertem L-Leucin geboten, so trat beginnend nach 10 min eine Veränderung der Leucin-Inkorporation auf, deren Ausmaß sich innerhalb von 30 min stark vergrö-

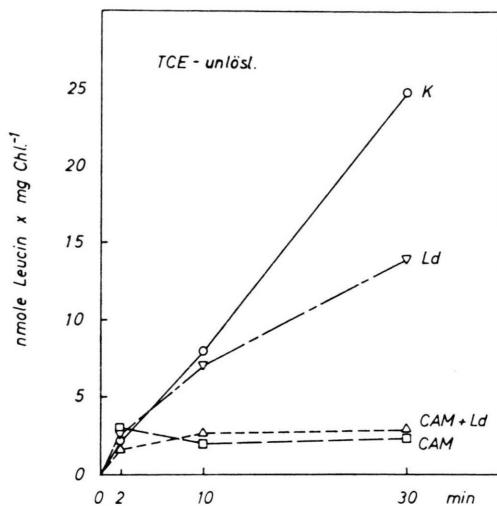


Abb. 1. Einfluß von Lindan (Ld) auf die Inkorporation von L-Leucin in die Proteinfaktion (TCE-unlöslich.) und die Hemmung der Inkorporation durch Chloramphenicol (CAM). Weißlicht.

ßerte (Abb. 1). CAM hemmte die durch Lindan beeinflußbare Leucin-Inkorporation. Das Ergebnis entspricht den oben erwähnten Versuchen bei *Acetabularia* [4]. Zur Prüfung der Frage, ob die Lindanwirkung auf eine Hemmung der Aminosäureaufnahme oder auf eine Beeinflussung der Proteinsynthese selbst zurückzuführen ist, wurde die Aufnahme der nichtmetabolisierbaren α -AIB untersucht (Abb. 2). Auffälligerweise zeigte sich nach einer Einwirkungszeit von 30 min durch Lindan und einer entsprechenden Aufnahmezeit von α -AIB im Weiß-

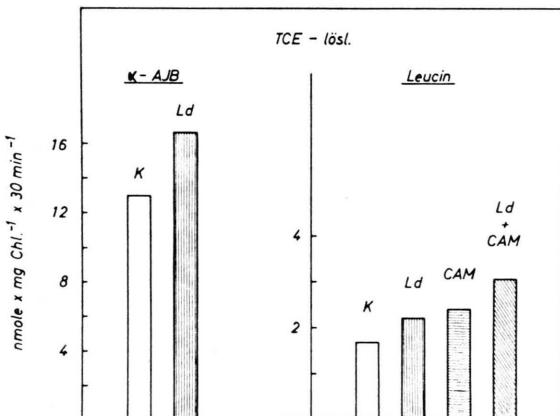


Abb. 2. Fehlende Hemmung der Aufnahme von α -Aminoiso-buttersäure (links) und L-Leucin durch Lindan, TCE-löslicher Anteil \pm CAM (rechts). Weißlicht.

licht keine Hemmung, sondern eher eine Förderung. Auch im monochromatischen Licht bei 630 nm (PS II + I) und bei 717 nm (PS I) wurde die Aufnahme von α -AIB durch Lindan (30 min) nicht nennenswert beeinflußt. DCMU (5×10^{-6} M) hemmt bei 630 nm die energiebedürftige Aufnahme von α -AIB partiell etwa auf die bei 717 nm gefundene Aufnahme, die bei 717 nm durch DCMU nicht weiter herabgesetzt wird. Da man die Leucinaufnahme auch allein nach Ausschaltung der Leucin-Inkorporation durch CAM messen kann [11], wurde der Lindaneinfluß unter solchen Bedingungen geprüft. Auch in diesem Fall zeigte sich, daß die in CAM-Gegenwart (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) geförderte Aufnahme in den TCE-löslichen Anteil durch Lindan nicht gehemmt wurde (Abb. 2).

Bei den gewählten Einwirkungszeiten von Lindan (30 min) wird im Gegensatz zur Vermutung von Borghi und Mitarb. [4] zumindest bei *Anacystis* die Aufnahme der untersuchten Aminosäuren demnach nicht oder noch nicht gehemmt. Insbesondere muß angenommen werden, daß der Carrier vermittelte Transport noch intakt ist und daß genügend Energie für diese energieabhängige Aufnahme zur Verfügung steht. Da die Inkorporation von Leucin zu diesem Zeitpunkt aber bereits durch Lindan stark gehemmt wird (Abb. 1), muß ein anderer durch Lindan hervorgerufener Hemmeffekt vorliegen, der die Leucin-Inkorporation in Protein beeinflußt.

Ein weiterer Versuch zur Leucin-Inkorporation im dunkelroten Licht (717 nm) ergab zunächst (Tab. I), daß auch bei 717 nm eine durch CAM hemmbare Inkorporation und damit eine Proteinsynthese stattfindet. Gleichzeitig ist wieder eine Erhöhung des löslichen Anteils zu beobachten. Auffällig ist aber, daß bei Belichtung mit dunkelrotem Licht, das nur

Tabelle I. Leucin-Aufnahme und Inkorporation in monochromatischem Licht von 717 nm in Gegenwart von Lindan und CAM. Versuchsdauer 30 min.

	nmol Leucin/mg Chlorophyll		
	TCE-lös.	TCE-unlös.	Gesamt
Kontrolle	3,34 (100) ¹	8,52 (100)	11,86 (100)
Lindan ($8,6 \times 10^{-5}$ M)	3,60 (108)	8,26 (97)	11,86 (100)
CAM (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	6,24 (187)	3,75 (44)	9,99 (84)

¹ % -Anteil.

eine Aktivität von PS I ermöglicht, Lindan fast keine Hemmung der von der Proteinsynthese abhängigen Leucin-Inkorporation bewirkt. Da im Weißlicht (Abb. 1) eine deutliche Hemmung auftrat, die auch bei 630 nm (hier nicht dargestellt) zu beobachten ist, scheint es 2 Anteile der Proteinsynthese zu geben, der eine wird stark, der andere hingegen nur wenig durch Lindan beeinflußt. Wir vermuten deshalb, daß die Proteinsynthese als solche durch Lindan kaum gehemmt werden dürfte. Es wurde vielmehr versuchsweise angenommen, daß ein Teil der Proteinsynthese unter Zuhilfenahme von Intermediärprodukten der CO_2 -Assimilation, insbesondere im Weißlicht, erfolgt, während dies bei derjenigen im dunkelroten Licht, wo durch das PS I nur ATP für die Proteinsynthese beigesteuert werden dürfte, nicht der Fall ist. Dies würde bedeuten, daß der Leucin-Einbau teilweise durch DCMU hemmbar sein müßte. In der Tat zeigte sich (Abb. 3), daß

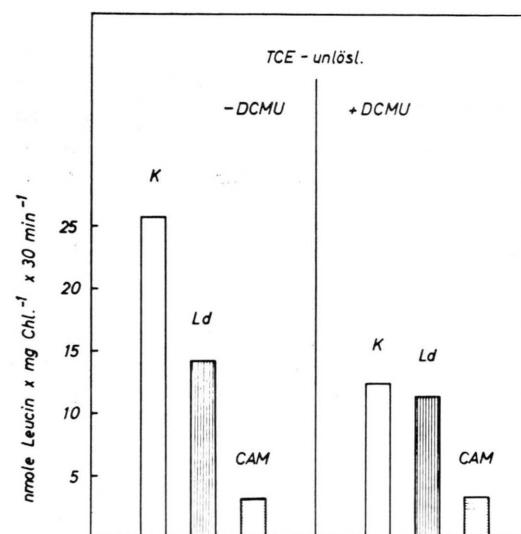


Abb. 3. Hemmung der Inkorporation von L-Leucin in Protein (TCE-unlös.) durch Lindan und CAM. Links: Kontrolle. Rechts: + DCMU (5×10^{-6} M).

DCMU im Weißlicht die Leucin-Inkorporation in die Proteinfaktion etwa in dem Ausmaß hemmt, wie dies allein durch Lindan geschieht. In Gegenwart von DCMU, wo lediglich von PS I abhängige Reaktionen ablaufen, hat Lindan nur noch eine schwach hemmende Wirkung. Demnach ist die Wirkstelle des Lindan nach 30 min Lindaneinwirkung offenbar weder im Bereich der Leucinaufnahme noch im Bereich der

Proteinsynthese zu suchen und dürfte zu diesem Zeitpunkt auch PS I-Reaktionen kaum betreffen, da im dunkelroten Licht keine Hemmung der Leucin-Inkorporation zu beobachten ist. Vielmehr scheint zu diesem Zeitpunkt eine besondere Wirkstelle des Lindan im Bereich derjenigen Photosynthesereaktionen vorzuliegen, die mit dem PS II im Zusammenhang stehen, sei es im Bereich der Primärprozesse von PS II oder der anschließenden CO₂-Assimilation. Wir haben deshalb die Wirkung von Lindan auf die CO₂-Fixierung untersucht. Nach unterschiedlich langen Lindan-Vorgaben wurde die CO₂-Fixierung jeweils für 10 min bestimmt (Tab. II). Bereits 10 min

Tabelle II. Einfluß von Lindan auf die ¹⁴CO₂-Fixierung in Abhängigkeit von der Zeit. Dauer der ¹⁴CO₂-Fixierung 10 Minuten.

Zeit der Lindan- einwirkung [min]	CO ₂ -Fixierung ($\mu\text{mol} \times \text{mg Chl}^{-1}$)		
	Kontrolle	Lindan $[8,6 \times 10^{-5} \text{ M}]$	Hemmung [%]
10	14,22	13,19	92,7
20	20,63	15,95	77,3
30	20,71	14,14	68,3

nach Beginn der Lindanbehandlung wurde eine geringe Abnahme der CO₂-Fixierung beobachtet, die sich mit der Zeit der Lindaneinwirkung vergrößerte. Nach 30 min wurde etwa eine 30-prozentige Hemmung gemessen.

Aus diesen Versuchen läßt sich entnehmen, daß Lindangaben von 30 min Dauer die energieabhängige Aufnahme der beiden Aminosäuren in *Anacystis* (Abb. 2 und Tab. I) nicht oder noch nicht beeinflussen. Es kommt aber deshalb zu einer Herabsetzung der Proteinsynthese im Weißlicht oder bei

monochromatischem Licht von 630 nm, weil Lindan zu diesem Zeitpunkt bereits eine deutliche Hemmung der CO₂-Fixierung hervorruft, die dann offenbar sekundär die Proteinsynthese beeinflußt. Bisher vorliegende Messungen der O₂-Produktion, die noch vervollständigt werden müssen, lassen vermuten, daß diese zum Zeitpunkt gleichlanger Lindaneinwirkung (30 min) weniger herabgesetzt ist als die CO₂-Fixierung. Außerdem kann die Hemmung durch Lindan infolge einer Hemmstelle im Bereich von PS II auch schon deshalb nicht sehr erheblich sein, weil die energieabhängige Aufnahmereaktion von α -AIB (630 nm) zwar durch DCMU, nicht aber von Lindan gehemmt wird. Es ist daher nicht unwahrscheinlich, daß neben der sich langsam verstärkenden Hemmung im Bereich des Elektronentransportsystems von PS II (vgl. [5] und entsprechenden Messungen von Böger an isolierten *Bumilleriopsis*-Chloroplasten, unveröffentlicht) noch eine weitere, relativ früh wirksam werdende Hemmstelle des Lindan im Bereich der CO₂-Fixierung bei *Anacystis* auftritt. Hier sind weitere Versuche erforderlich.

Abschließend ist festzustellen, daß der aktive Transport der untersuchten 2 neutralen Aminosäuren während der Zeit der untersuchten Lindanwirkung nicht gehemmt wurde. Hingegen traten erhebliche Hemmeffekte im Bereich der Photosynthese und ihrer Folgereaktionen auf, die zu einer Herabsetzung der Proteinsynthese führen. Lindan beeinflußt also keineswegs alle an Membranen ablaufenden Vorgänge in gleichem Ausmaß.

Danksagung

Die DFG unterstützte diese Untersuchungen durch eine Sachbeihilfe. Fräulein S. Hupmann danken wir für ihre sorgfältige Assistenz.

- [1] E. Ullmann, Lindan, Monographie eines insektiziden Wirkstoffes. Verlag K. Schillinger, Freiburg 1973.
- [2] K. Kopecek, F. Füller, W. Ratzmann und W. Simonis, Ber. Deutsch. Bot. Ges. **88**, 269 (1975).
- [3] T. Narahashi, Advances in Insect. Physiol. **8**, 1 (1971).
- [4] H. Borghi, S. Puiseux-Dao, S. Bonotto und D. Hoursiangou-Neubrunn, Protoplasma **78**, 99 (1973).
- [5] A. Wild, A. L. Oberweis und W. Ruehle, Z. Pflanzenphysiol. **82**, 161 (1977).
- [6] K. Schefczik und W. Simonis, Pesticide Biochem. Physiol. (im Druck) (1979).
- [7] K. Schefczik und W. Simonis, Z. Naturforsch. **34 c**, (im Druck) (1979).
- [8] R. Y. Stanier und G. Cohen-Bazire, Ann. Rev. Microbiol. **31**, 225 (1977).
- [9] J. Lee-Kaden und W. Simonis, Plant and Cell Physiol. (zum Druck eingereicht) (1979).
- [10] T. Bornefeld und W. Simonis, Planta **115**, 309 (1977).
- [11] J. R. Piperno und D. L. Oxender, Biol. Chem. **243**, 5914 (1968).