

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 Vorbelichtungsphase bei verschiedenen Temperaturen untersucht.

Experimentelles

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

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. G. Döhler.
0341-0382/80/1100-0978 \$ 01.00/0

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 raschwüchsigen 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 Zuckermanophosphate (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 Calcin-Cyclus offensichtlich gleichzeitig erfolgt. Die Markierung von Glycin/



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.

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 Zuckermanophosphaten. Ab 30 sec fanden wir Fructose-1,6-bisphosphat (1%) und Sedoheptulose-1,7-bisphosphat, was mit dem Ablauf des oxidativen Pentosephosphatweges erklärt werden kann

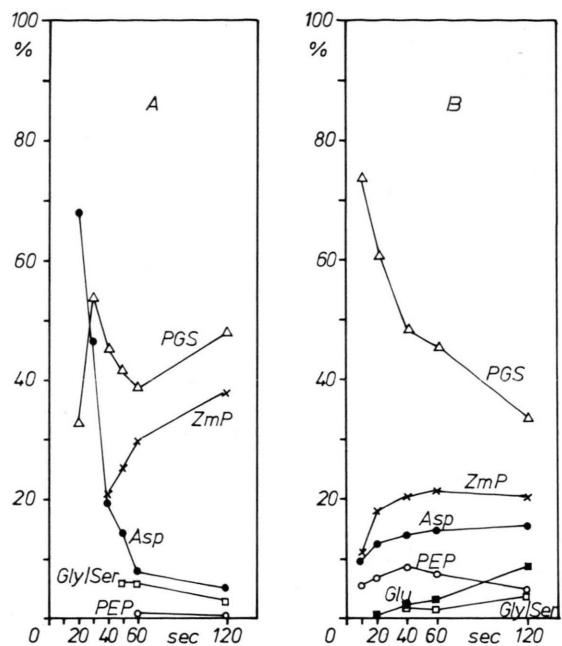


Abb. 2. Kinetik des ¹⁴C-Einbaus in verschiedene Substanzen (prozentuale Verteilung) während der Photosynthese-Induktion (Teil A) und der stationären Photosynthese nach 10 min (Teil B) von *Synechococcus* (*Anacystis nidulans*, Stamm L 1402-1) bei + 35 °C. Weitere Angaben siehe Abb. 1.

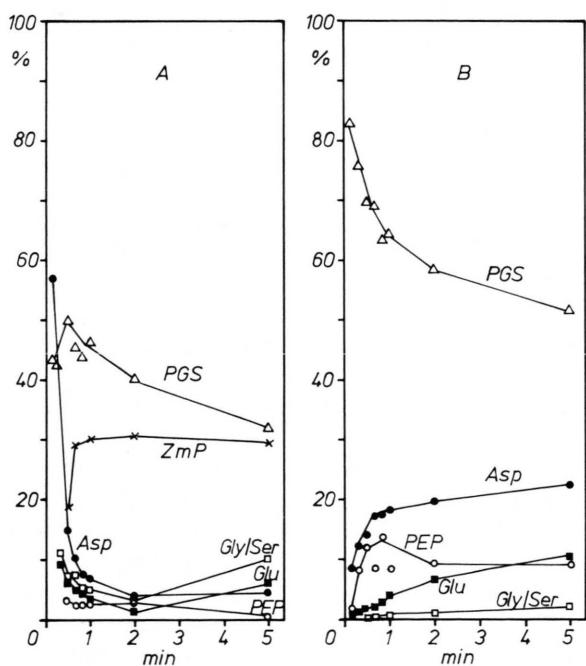


Abb. 1. Kinetik des ¹⁴C-Einbaus in verschiedene Substanzen (prozentuale Verteilung) während der Photosynthese-Induktion (Teil A) und der Dunkel-CO₂-Fixierung nach 5 min Vorbelichtung (Teil B) von *Synechococcus* (*Anacystis nidulans*, Stamm L 1402-1) bei + 30 °C. Vor Versuchsbeginn wurde 1 h mit Preßluft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

[2]. Der mit zunehmender Fixierungsduer auftretende Anstieg der Radioaktivität in Aspartat und Phosphoenolpyruvat zeigt, daß unter diesen Bedingungen, d. h. Dunkel-CO₂-Fixierung nach Vorbelaichung, 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 Vorbelaichungszeit (1 oder 5 min) hatte keinen Einfluß auf den prozentualen Anteil der einzelnen Produkte oder deren Zusammensetzung: Nach längerer Vorbelaichung nahm lediglich die Gesamtfixierungsrate zu. Bei *Chlorella* wurde ein ähnliches Muster in der prozentualen Verteilung der einzelnen Substanzen nach Vorbelaichung 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 Preßluft (0,03 vol.% CO₂) begast. Die Radioaktivität ist in dpm angegeben [¹⁴C]Bicarbonatgabe nach 10 min Photosynthese.

Substanz	15 °C						2 min [dpm]	[%]
	10 sec [dpm]	[%]	20 sec [dpm]	[%]	40 sec [dpm]	[%]		
Aspartat	18	32,8	60	36,9	183	34,4	385	39,7
3-Phosphoglycerinsäure	38	67,2	103	63,1	300	56,5	483	49,7
Zuckermanophosphate	—	—	—	—	—	—	—	—
Fructose-1,6-bisphosphat	—	—	—	—	—	—	—	—
Phosphoenolpyruvat	—	—	—	—	49	9,2	78	8,0
Glycin/Serin	—	—	—	—	—	—	—	—
Alanin	—	—	—	—	—	—	—	—
Glutamat	—	—	—	—	—	—	25	2,6
Isoleucin	—	—	—	—	—	—	—	—
Uridindiphosphoglucose	—	—	—	—	—	—	—	—
Malat	—	—	—	—	—	—	—	—
Gesamtfixierungsrate	56		163		531		970	
							2523	
Substanz	35 °C						2 min [dpm]	[%]
	10 sec [dpm]	[%]	20 sec [dpm]	[%]	40 sec [dpm]	[%]		
Aspartat	360	9,6	1590	12,6	4530	14,0	8235	14,7
3-Phosphoglycerinsäure	2765	73,7	7630	60,5	15660	48,4	25400	45,3
Zuckermanophosphate	420	11,2	2300	18,2	6495	20,1	11995	21,4
Fructose-1,6-bisphosphat	—	—	—	—	330	1,0	590	1,1
Phosphoenolpyruvat	205	5,5	830	6,6	2780	8,6	4140	7,4
Glycin/Serin	—	—	—	—	720	2,2	950	1,7
Alanin	—	—	—	—	390	1,2	835	1,5
Glutamat	—	—	115	0,9	705	2,2	1925	3,4
Isoleucin	—	—	—	—	—	—	—	1150
Uridindiphosphoglucose	—	—	—	—	—	—	970	1,7
Malat	—	—	155	1,2	765	2,4	1065	1,9
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 gemesen 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 Zuckermanophosphate 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 steile 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 GesamtCO₂-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).