Ferredoxin als Kofaktor der cyclischen Photophosphorylierung in einem zellfreien System aus der Blaualge *Anacystis nidulans*

HERMANN BOTHE

Ferredoxin-catalysed Cyclic Photophosphorylation in Lyophilised and Lysozyme Treated *Anacystis nidulans*

Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Göttingen, Abt. Biochemie der Pflanzen

(Z. Naturforschg. **24 b**, 1574—1582 [1969]; eingegangen am 9. August 1969)

The properties of the ferredoxin-catalysed cyclic photophosphorylation in lyophilised and lysozyme treated *Anacystis nidulans* with rates up to 80 μ moles ATP/h/mg chlorophyll are described. The concentration of ferredoxin needed for the saturation of the ferredoxin-catalysed cyclic photophosphorylation is about 6—8 times higher than for NADP-reduction. In contrast to the ferredoxin-catalysed cyclic photophosphorylation in spinach chloroplasts the reaction in *Anacystis* is relatively intensive to the "poising" of the system and is not affected by antimycin A. Whilst under aerobic conditions in broken chloroplasts ferredoxin catalyses a pseudocyclic photophosphorylation in which H_2O_2 is a component, in *Anacystis* on addition of ferredoxin ATP is only formed on the cyclic pathway even in air. In chloroplasts as well as in *Anacystis* disulfo-disalicylidenpropandiamin (DSPD) inhibits only the ferredoxin-catalysed cyclic photophosphorylations and the NADP-reductions, but not the ferredoxin stimulated ATP-formations under aerobic conditions. Evidence is presented once more that ferredoxin is the cofactor of cyclic photophosphorylation in vivo.

In isolierten Chloroplasten¹ lassen sich nur dann cyclische Photophosphorylierungen nachweisen, wenn bestimmte Kofaktoren zu den Präparationen zugesetzt werden. Die Kofaktoren können natürlicher (wie Chinone oder FMN*) oder unphysiologischer (wie PMS oder DCPIP) Herkunft sein. Unter ihnen hat Ferredoxin besondere Bedeutung, da Ferredoxin wahrscheinlich der Kofaktor in vivo ist². Die Ferredoxin-katalysierte cyclische Photophosphorylierung ist allerdings nur in isolierten Chloroplasten höherer Pflanzen nachgewiesen worden³, nicht aber in Präparationen aus Blaualgen, obwohl cyclische Photophosphorylierungen mit allen anderen Kofaktoren dort bekannt geworden sind⁴⁻⁸. In der Blaualge *Anacystis nidulans* läßt sich eine Ferredoxin-katalysierte cyclische Photophosphorylierung mit einer nicht unbeträchtlichen Rate in einer durch Lyophilisation und Lysozymbehandlung gewonne-

nen Präparation nachweisen. Die Eigenschaften dieser Reaktion werden im folgenden beschrieben, und es sollen die Ferredoxin-katalysierten cyclischen Photophosphorylierungen in der Präparation aus *Anacystis* und in „broken chloroplasts“ miteinander verglichen werden.

Methodik

Die Anzucht der Blaualge *Anacystis nidulans* Richter (Stamm 1402-1 der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Institutes der Universität Göttingen) erfolgte in einer nach KRATZ und MYERS⁹ modifizierten Nährlösung (vgl. l. c.¹⁰) und in einer von LORENZEN¹¹ beschriebenen Kulturanlage bei 35 °C, 3000 Lux und einer Begasung mit einem Kohlendioxid-Luftgemisch (1,5 Vol.-% CO_2). Die Herstellung des zellfreien Systems aus *Anacystis* wurde im wesentlichen bereits beschrieben⁶. Algen mit einem Naßgewicht von 0,5 bis 0,6 g (aus der log. Wachstumsphase) wurden mit dest.

* Verwendete Abkürzungen: PMS = Methylphenazonium-methosulfat; FMN = Flavinmononucleotid; ADP und ATP = Adenosindi- und triphosphat; DCMU = Dichlorphenyldimethylharnstoff; NADP und $NADPH_2$ = oxyd. und red. Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat; Chl. = Chlorophyll; DSPD = Disulfo-disalicylidenpropandiamin; DCPIP = Dichlorphenolindophenol.

¹ D. I. ARNON, Science [Washington] **122**, 3157 [1955].

² D. I. ARNON, H. Y. TSUJIMOTO u. B. D. MCSWAIN, Nature [London] **214**, 562 [1967].

³ K. TAGAWA, H. Y. TSUJIMOTO u. D. I. ARNON, Proc. nat. Acad. Sci. USA **49**, 567 [1963].

⁴ B. PETRACK u. F. LIPMANN, in: Light and Life, Hrsg. W. D. McELROY u. B. GLASS, The Hopkins Press, Baltimore, 1961, S. 621.

⁵ W. C. DUANE, M. C. HOHL u. D. W. KROGMANN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **109**, 108 [1965].

⁶ B. GERHARDT u. A. TREBST, Z. Naturforschg. **20 b**, 879 [1965].

⁷ J. BIGGINS, Plant Physiol. **42**, 1447 [1967].

⁸ S. S. LEE, A. M. JOUNG u. D. W. KROGMANN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **180**, 130 [1969].

⁹ W. A. KRATZ u. J. MYERS, Amer. J. Bot. **42**, 282 [1955].

¹⁰ H. BOTHE, Dissertation, Göttingen 1968.

¹¹ H. LORENZEN, Flora [Jena] **147**, 382 [1959].

Wasser gewaschen, nach der Zentrifugation bei 5000 g in 5-proz. Saccharose gelöst in 5 ml 0,02 M Hepes-Puffer pH 7,0 resuspendiert, bei -60°C eingefroren und 2–3 Stdn. lyophilisiert. Unmittelbar darauf wurde das erhaltene Trockenpulver in $4 \cdot 10^{-2}$ M MgCl_2 gelöst in 0,02 M Hepes-Puffer pH 7,0 aufgenommen und mit Lysozym (Calbiochem. Nr. 62783, 2 mg Lysozym/0,2 mg Chlorophyll) versetzt. Die Wirkung von Lysozym auf die lyophilisierten *Anacystis*-Zellen wurde bereits früher beschrieben¹². Die Lysozyminkubation erfolgte 90 Min. lang bei 25°C unter kontinuierlichem Schütteln. Danach wurden die aufgebrochenen Zellen entweder getestet (Präparation N_{Lys}) oder bei 20 000 g 5 Min. lang abzentrifugiert, aufgenommen in 0,02 M Hepes-Puffer pH 7,0, erneut bei 20 000 g 5 Min. lang zentrifugiert und mit 0,02 M Hepes-Puffer pH 7,0 (0,2 mg Chl./ml Puffer) suspendiert (Präparation R_2).

Die Reaktionsansätze zur Bestimmung der photosynthetischen Aktivitäten der Präparationen aus *Anacystis* in konischen Warburg-Gefäßen mit etwa 14 ml Inhalt enthielten in einem Gesamtvolumen von 3 ml, wenn nicht anders angegeben: 1 ml der Algenpräparation mit einem Chlorophyllgehalt von 0,2 mg, 100 μMol Hepes-Puffer pH 7,0, 40 μMol MgCl_2 , 10 μMol ADP, 10 μMol Na_2HPO_4 radioaktiv markiert ($\sim 100\,000$ ipm ^{32}P) und die in den Legenden der Tabn. bzw. Abbn. angegebenen Zusätze. Nach Äquilibrierung der Gefäße mit nachgereinigtem N_2 bzw. Luft (5 Min.) wurden die Versuche bei 25°C 20 Min. lang bei 35000 Lux (Philips-Attralux-Lampen) im Warburg-Apparat ausgeführt. In einigen Versuchen wurden zwischen der Lichtquelle und den Warburg-Gefäßen im Warburg-Apparat RGI-Filter, Schott und Gen. Mainz, befestigt, die Lichtintensität an den Warburg-Gefäßen betrug dann $1,0 \cdot 10^5$ erg $\cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$.

Die Sauerstoffentwicklung wurde manometrisch verfolgt. Die gebildeten Mengen an NADPH_2 wurden unmittelbar nach dem Ende des Versuches in einem Aliquot der bei 20 000 g 5 Min. lang abzentrifugierten Proben durch die Messungen der Extinktionen bei 340 μm vor und nach Zugabe von 0,03 ml einer PMS-Lösung (1 mg PMS/ml) zur Meßküvette und zur Vergleichsküvette ermittelt. Unmittelbar nach Entnahme des Aliquots für die NADPH_2 -Bestimmung wurden die Proben mit 0,4 ml 20-proz. Trichloressigsäure gestoppt. Das gebildete ATP wurde nach SUGINO und MIYOSHI¹³ nach Fällung des anorganischen Phosphates mit Ammoniummolybdat über das in organisches Phosphat eingebaute ^{32}P an einem Endfensterzählrohr bestimmt.

Zur Bestimmung der H_2O_2 -Bildung wurde ein Aliquot des Überstandes der abzentrifugierten Proben mit einer frisch hergestellten Titanylulfat-Lösung versetzt und die optische Dichte des entstandenen Komplexes

bei 395 μm bestimmt. Aus einer Eichkurve mit H_2O_2 wurde der Extinktionskoeffizient mit $0,75 \text{ mMol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ermittelt.

Die Extraktionen und Mengenbestimmungen des Chlorophylls erfolgten in 80-proz. Aceton nach MACKINNEY¹⁴ unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten von $82 \text{ mMol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 663 μm . Die Versuche mit isolierten Chloroplasten, hergestellt nach ARNON¹, wurden im Warburg-Apparat entsprechend wie die mit den Präparationen aus *Anacystis* durchgeführt. Ferredoxin aus Spinat wurde nach der von ARNON³ beschriebenen Methode gewonnen und hatte ein Verhältnis der optischen Dichten von 420 zu 280 μm um 0,3. Die Herstellung von Ferredoxin aus *Anacystis nidulans* erfolgte im wesentlichen nach der von SMILLIE¹⁵ angegebenen Methode (vgl. l. c.¹⁰), das Verhältnis der optischen Dichten von 420 zu 280 μm betrug 0,4–0,45. Zur Berechnung der Mengen an Ferredoxin wurde ein Extinktionskoeffizient von $10,32 \text{ mMol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ¹⁶ verwendet.

Ergebnisse

Neben Kofaktoren wie Menadion, PMS oder FMN^{6,17} katalysiert auch Ferredoxin eine cyclische Photophosphorylierung in Blaualgen. Das läßt sich bereits in lyophilisierter und Lysozym-behandelter *Anacystis nidulans* aber noch besser in nach der Lyophilisation und Lysozymbehandlung mit verdünntem Puffer extrahierten Algen zeigen. Durch die Extraktion werden das zugesetzte Lysozym und die wasserlöslichen Proteine der Algen, u. a. der größte Teil des Phycocyanins und des Ferredoxins von der Präparation entfernt. In der so erhaltenen Präparation wird bei Belichtung nur wenig ATP gebildet; erst nach Zusatz von Ferredoxin zum Versuchsansatz läßt sich eine ATP-Bildung bis zu 80 $\mu\text{Mol/h/mg}$ Chlorophyll messen (Tab. 1). Somit

	gebildete $\mu\text{Mol ATP}$
ohne Kofaktor	0,85
+ 95 μMol Ferredoxin, Dunkelkontrolle	0,3
+ 95 μMol Ferredoxin	4,1
+ 0,3 μMol PMS	6,4

Tab. 1. Ferredoxin und PMS als Katalysatoren der cyclischen Photophosphorylierung in lyophilisierter, Lysozym-behandelter und extrahierter *Anacystis*. Reaktionsbedingungen: 3 ml Reaktionsvolumen, Algen (R_2) mit 0,2 mg Chl., Ferredoxin aus *Anacystis*, pH 7,0, 10^{-6} M DCMU außer im Gefäß mit PMS, 20 Min. Licht bei 35000 Lux und 25°C .

¹² B. GERHARDT, Ber. dtsch. bot. Ges. **78**, 400 [1966].

¹³ Y. SUGINO u. Y. MIYOSHI, J. biol. Chemistry **239**, 2360 [1964].

¹⁴ G. MACKINNEY, J. biol. Chemistry **140**, 315 [1941].

¹⁵ R. M. SMILLIE, Plant Physiol. **40**, 1124 [1965].

¹⁶ F. R. WHATLEY, K. TAGAWA u. D. I. ARNON, Proc. nat. Acad. Sci. USA **49**, 266 [1963].

¹⁷ B. GERHARDT u. R. SANTO, Z. Naturforschg. **21b**, 673 [1966].

ist die Rate der Ferredoxin-katalysierten cyclischen Photophosphorylierung erheblich, sie ist unter den in Tab. 1 angegebenen Versuchsbedingungen nur um etwa $\frac{1}{3}$ geringer als die der PMS-katalysierten. Der Verlauf der Reaktion ist mindestens während 20 Min. linear.

Auch in isolierten Chloroplasten aus Spinat läßt sich eine Ferredoxin-katalysierte cyclische Photophosphorylierung erst nach Zusatz von Ferredoxin messen. Allerdings ist die Ferredoxin-katalysierte cyclische Photophosphorylierung in isolierten Chloroplasten nur nachzuweisen^{18, 19, 2} a) unter streng anaeroben Bedingungen, b) wenn Filter verwendet werden, die undurchlässig für kurzwelliges Licht sind, da möglicherweise Ferredoxin im Weißlicht inaktiviert wird²⁰, c) wenn sich die an der cyclischen Photophosphorylierung beteiligten Kofaktoren in einem bestimmten Redoxzustand befinden. Dieser Redoxzustand kann experimentell dadurch erreicht werden, daß die Kofaktoren der cyclischen Photophosphorylierung durch den offenkettigen Elektronentransport reduziert werden. Allerdings darf der offenkettige Elektronentransport nur mit einer schwachen, genau bestimmten Rate ablaufen; wäre die Rate zu groß, würden die Kofaktoren der cyclischen Photophosphorylierung überreduziert werden, wäre sie zu gering, so wäre die Reduktion der Kofaktoren nicht ausreichend („poising des Systems“). Die benötigte Rate des offenkettigen Elektronentransportes kann durch Verwendung einer bestimmten Konzentration des Hemmstoffes DCMU eingestellt werden. In Abb. 1 ist nochmals dokumentiert, wie kritisch im Chloroplastensystem die DCMU-Konzentration ist; sie ändert sich stark mit den Versuchsbedingungen, etwa mit dem Chloroplastengehalt im Versuchsansatz. Im Vergleich zu den Verhältnissen in isolierten Spinatchloroplasten ist — unter gleichen Versuchsbedingungen — die Ferredoxin-katalysierte cyclische Photophosphorylierung in lyophilisierter *Anacystis* nur wenig DCMU-abhängig (Abb. 1). Die Elektronenüberträger der Ferredoxin-katalysierten cyclischen Photophosphorylierung scheinen in der Präparation aus *Anacystis* bereits in einem geeigneteren Redoxzustand zu sein, so daß in dem System aus *Anacystis* ein „poising“

Abb. 1. DCMU-Abhängigkeit der Ferredoxin-katalysierten cyclischen Photophosphorylierung in *Anacystis* und in Chloroplasten. Reaktionsbedingungen: a) *Algen*: Präparation N_{LYS}, 1,5 ml Reaktionsvolumen, 35 m μ Mol Ferredoxin aus Spinat, pH 7,0, 30 Min. im Rotlicht (RGI-Filter) bei 25 °C. b) „broken chloroplasts“: P_{1S1}, 1,5 ml Reaktionsvolumen, 130 m μ Mol Ferredoxin aus Spinat, pH 8,5, 15 Min. im Rotlicht (RGI-Filter) bei 15 °C.

kaum notwendig erscheint. Wenn auch die Ferredoxin-katalysierte cyclische Photophosphorylierung in dem System aus *Anacystis* nur schwach DCMU-abhängig ist, so zeigt die geringe Stimulierung der Reaktion durch DCMU doch, daß es sich bei ihr um eine cyclische und nicht um eine pseudocyclische Photophosphorylierung handelt, wie noch ausführlicher dargestellt wird.

Wie in isolierten Chloroplasten²¹ werden auch in dem System aus *Anacystis* zur optimalen Reaktion höhere Konzentrationen an Ferredoxin für die cyclische Photophosphorylierung als für die NADP-Reduktion benötigt (Abb. 2). Während lyophilisierte und Lyozym-behandelte Algen für die NADP-Reduktion sättigende Mengen an Ferredoxin enthalten und eine Abhängigkeit der NADP-Reduktion von Ferredoxin erst nach Extraktion der Algen deutlich wird¹⁰, läßt sich bereits in nicht extrahierten Algen eine Stimulierung der cyclischen ATP-Bildung durch Zusatz von Ferredoxin zeigen¹⁰. Wie aus Abb. 2 deutlich wird, ist in extrahierten Algen

¹⁸ D. I. ARNON, in: Biochemistry of Chloroplasts, Hrsg. T. W. GOODWIN, Acad. Press, New York-London 1967, Vol. II, S. 461.

¹⁹ B. R. GRANT u. F. R. WHATLEY, in: Biochemistry of Chloroplasts, Acad. Press, New York-London 1967, Vol. II, S. 505.

²⁰ D. I. ARNON, in: Currents of Photosynthesis, Hrsg. J. B. THOMAS u. J. C. GOODHEER, A. Donker-Publisher, Rotterdam, 1966, Diskussion, S. 479.

²¹ D. I. ARNON, International Congress of Photosynthesis Research, Freudenstadt, im Druck.

Abb. 2. Stimulierung der photosynthetischen ATP-Bildung in *Anacystis* durch Ferredoxin. Reaktionsbedingungen: 3 ml Reaktionsvolumen, Algen (R_2) mit 0,2 mg Chl., pH 7,0 mit Ausnahme des NADP-Systems (pH 8,0), 20 Min. Licht bei 35000 Lux und 25 °C.

die Sättigungskonzentration an Ferredoxin für die Ferredoxin-katalysierte cyclische Photophosphorylierung etwa 6–8-mal höher als für die NADP-Reduktion. Im Gegensatz zu den Verhältnissen in isolierten Chloroplasten² sind die ermittelten ATP-Werte in der Ferredoxin-katalysierten cyclischen Photophosphorylierung der Präparation aus *Ana-*

Abb. 3. pH-Abhängigkeit der Ferredoxin-katalytischen cyclischen Photophosphorylierung in *Anacystis* und in Chloroplasten. Reaktionsbedingungen: a) Algen: Präparation N_{Lys} mit 0,1 mg Chl., 1,5 ml Reaktionsvolumen, 35 µMol Ferredoxin aus Spinat, $8 \cdot 10^{-7}$ M DCMU, 30 Min. im Rotlicht (RGI-Filter) bei 25 °C. b) „broken chloroplasts“: P_1S_1 mit 0,1 mg Chl., 1,5 ml Reaktionsvolumen, 130 µMol Ferredoxin aus Spinat, $4 \cdot 10^{-7}$ M DCMU, 15 Min. im Rotlicht (RGI-Filter) bei 15 °C.

cystis höher als in der offenkettigen Photophosphorylierung mit NADP als Elektronenakzeptor.

Unterschiedlich ist das pH-Optimum in der Ferredoxin-katalysierten cyclischen Photophosphorylierung in Blaualgen und in Chloroplasten. KROGMANN stellte für die cyclischen Photophosphorylierungen mit PMS oder Menadion und FMN als Kofaktoren in einer Präparation aus *Anabaena cylindrica* ein pH-Optimum um 7,0 fest⁵. Aus Abb. 3 wird deutlich, daß auch die Ferredoxin-katalysierte cyclische Photophosphorylierung in lyophilisierter und Lysozym-behandelter *Anacystis* ein scharfes Optimum bei pH 7,0 hat. Im Vergleich dazu hat die Ferredoxin-katalysierte cyclische Photophosphorylierung isolierter Chloroplasten ihre maximale Rate bei einem pH-Wert von etwa 8,0, jedoch ist das Maximum im pH-Bereich 7,5–8,5 nicht scharf ausgeprägt.

TAGAWA et al.³ berichteten, daß in isolierten Chloroplasten nur die Ferredoxin-katalysierte cyclische Photophosphorylierung, nicht aber die cyclischen Photophosphorylierungen mit anderen Kofaktoren oder die offenkettige Photophosphorylierung Antimycin-empfindlich ist. Auch in dem in Abb. 4 dargestellten Versuch wird die Reaktion

Abb. 4. Wirkung von Antimycin A auf die Ferredoxin-katalysierten cyclischen Photophosphorylierungen in *Anacystis* und in Chloroplasten. Reaktionsbedingung: a) Algen: Präparation R_2 mit 0,2 mg Chl., 3 ml Reaktionsvolumen, 100 µMol Ferredoxin *Anacystis*, pH 7,0, 10^{-6} M DCMU, 20 Min. Licht bei 35000 Lux und 25 °C. b) „broken chloroplasts“: P_1S_1 mit 0,2 mg Chl., 1,5 ml Reaktionsvolumen, 100 µMol Ferredoxin aus *Anacystis*, $8 \cdot 10^{-7}$ M DCMU, 15 Min. im Rotlicht (RGI-Filter) bei 15 °C.

durch $2,5 \cdot 10^{-6}$ M Antimycin A fast vollständig gehemmt. Überraschenderweise ist im Gegensatz dazu die Ferredoxin-katalysierte cyclische Photophosphorylierung in lyophilisierter *Anacystis* unempfindlich gegen diesen Hemmstoff (Abb. 4). Erst bei einer Konzentration von 10^{-4} M Antimycin A läßt sich eine geringe Hemmung der Ferredoxin-katalysierten cyclischen Photophosphorylierung nachweisen, allerdings wird bei dieser hohen Konzentration auch die NADP-Reduktion im gleichen Maße gehemmt. Die Ferredoxin-katalysierte cyclische Photophosphorylierung in *Anacystis* wird auch dann nicht empfindlicher gegen Antimycin, wenn die Versuchsbedingungen variiert werden (vgl. dazu l.c.^{22, 23}). Insbesondere läßt sich bei geringen Lichtintensitäten, bei denen der Elektronentransport die Phosphorylierungsrate limitiert, in der Präparation aus *Anacystis* keine verstärkte Hemmung der Ferredoxin-katalysierten cyclischen Photophosphorylierung feststellen (Tab. 2).

Nach TREBST und BURBA²⁴ hemmt Disulfo-disalicylidenpropandiamin (DSPD) nur die Ferredoxin-abhängigen photosynthetischen Reaktionen, insbesondere aber nicht die cyclischen Photophosphorylierungen mit anderen Kofaktoren als Ferredoxin. Die Wirkung von DSPD auf die Ferredoxin-katalysierten cyclischen Photophosphorylierungen wurde bislang nicht getestet und wird aus Tab. 3 deutlich. Sowohl in Chloroplasten als auch in dem

	gebildete μ Mol ATP
ohne Ferredoxin	0,7
+ 70 μ Mol Ferredoxin	1,2
+ 70 μ Mol Ferredoxin + 10^{-5} M Antimycin A	1,15
+ 70 μ Mol Ferredoxin + 5×10^{-5} M Antimycin A	1,0
+ 70 μ Mol Ferredoxin + 10^{-4} M Antimycin A	1,1

Tab. 2. Wirkung von Antimycin A auf die Ferredoxin-katalysierte cyclische Photophosphorylierung in *Anacystis* bei niedriger Lichtintensität. Reaktionsbedingungen: 3 ml Reaktionsvolumen, Algen (R_2) mit 0,2 mg Chl., Ferredoxin aus *Anacystis*, pH 7,0, 10^{-6} M DCMU, 30 Min. Licht bei 3000 Lux und 25 °C.

zellfreien System aus *Anacystis* hemmt DSPD sowohl die NADP-Reduktion als auch die Ferredoxin-katalysierte cyclische Photophosphorylierung. Dagegen werden die Ferredoxin-abhängigen pseudocyclischen Photophosphorylierungen (s. u.) durch den Hemmstoff nicht beeinflußt.

In isolierten Chloroplasten stimuliert Ferredoxin eine pseudocyclische Photophosphorylierung. Bei dieser Reaktion wird das photosynthetisch reduzierte Ferredoxin durch den Sauerstoff, der aus der Wasserspaltung entsteht, reoxidiert. Obwohl sich nur eine ATP-Bildung und kein Gaswechsel messen läßt, wird bei dieser Reaktion ATP natürlich nicht im cyclischen sondern im offenkettigen Elektronentransport gebildet (l.c.^{3, 25}). Unterscheiden lassen sich cyclische und pseudocyclische Photophosphorylie-

	unter N ₂ gebildete μ Mol ATP	unter Luft μ Mol ATP	NADP-Reduktion entwickelte μ Atome O	gebildete μ Mol NADPH ₂	μ Mol ATP
a) <i>Anacystis</i> -Präparation					
ohne Fd.	0,85	1,6	1,0	1,2	0,7
+ Fd.	4,1	4,1	3,0	3,3	2,15
+ Fd. + $5 \cdot 10^{-4}$ M DSPD	2,0	4,25	1,7	1,5	1,45
+ Fd. + $2 \cdot 10^{-3}$ M DSPD	0,8	3,0	0,5	0,6	0,75
b) <i>Chloroplasten</i>					
ohne Fd.	0,05	0,2	0,3	0,25	0,4
+ Fd.	0,9	2,2	2,3	2,1	2,05
+ Fd. + $5 \cdot 10^{-4}$ M DSPD	0,15	1,8	1,0	0,8	1,4
+ Fd. + $2 \cdot 10^{-3}$ M DSPD	0,05	1,9	0,3	0,1	0,45

Tab. 3. Wirkung von Disalicylidenpropandiamin auf die Ferredoxin-stimulierten ATP-Bildungen in Stickstoff und in Luft und auf die NADP-Reduktion. Reaktionsbedingungen: a) *Anacystis*: Präparation R_2 mit 0,2 mg Chl., 3 ml Reaktionsvolumen; pH 7,0, 0,1 μ Mol Ferredoxin *Anacystis*, 10^{-6} M DCMU im cyclischen System; pH 8,0, 6 μ Mol NADP, 20 μ Mol Ferredoxin im NADP-System; 20 Min. Licht bei 350000 Lux (ohne RGI-Filter) und 25 °C. b) *Chloroplasten*: P_1S_1 mit 0,1 mg Chl., 1,5 ml Reaktionsvolumen, pH 8,2; 0,1 μ Mol Ferredoxin Spinat, $4 \cdot 10^{-6}$ M DCMU im cyclischen System; 6 μ Mol NADP, 20 μ Mol Ferredoxin im NADP-System; 15 Min. Licht bei 15 °C, RGI-Filter.

²² S. IZAWA, T. N. CONOLLY, G. D. WINGET u. N. E. GOOD, in: Brookhaven Symposia in Biology **19**, 169 [1966].

²³ J. C. WESSELS, in der Diskussion zu l. c.²⁰, S. 479.

²⁴ A. TREBST u. M. BURBA, Z. Pflanzenphysiol. **57**, 419 [1967].

²⁵ D. I. ARNON, H. Y. TSUJIMOTO u. B. D. MCSWAIN, Proc. nat. Acad. Sci. USA **51**, 1274 [1964].

			unter N ₂	unter Luft	NADP-Reduktion		
			gebildete	gebildete	gebildete	entwickelte	
			μMol ATP	μMol ATP	μMol ATP	μMol NADPH ₂	μAtome O
—			0,3	0,9	0,6	1,1	0,9
+ Fd.			0,8	2,7	2,2	3,4	3,0
+ Fd. + DCMU 10 ⁻⁶ M			2,6	2,4	0,3	1,0	0,75
+ Fd. + DCMU 2,5 · 10 ⁻⁶ M			2,4	1,8	0,3	0,6	0,7
+ Fd. + DCMU 5 · 10 ⁻⁶ M			2,7	0,8	0,25	0,5	0,4
+ Fd. + DCMU 10 ⁻⁵ M			2,1	0,3	0,25	0,45	0,4
+ Fd. + DCMU 10 ⁻⁴ M			0,3	0,1	0,2	0,2	0,2
— + DCMU 10 ⁻⁶ M			0,2				

Tab. 4. Hemmung der Ferredoxin-abhängigen photosynthetischen Reaktionen in *Anacystis* durch DCMU. Reaktionsbedingungen: 3 ml Reaktionsvolumen, Algen (R₂) mit 0,2 mg Chl.; pH 7,0, 80 μMol Ferredoxin Spinat im cyclischen System; pH 8,0, 6 μMol NADP, 20 μMol Ferredoxin im NADP-System; 20 Min. Licht bei 35000 Lux und 25 °C (Fd. = Ferredoxin).

rungen durch die Hemmbarkeit mit DCMU. Bei bestimmten DCMU-Konzentrationen und in Gegenwart von sättigenden Mengen an Ferredoxin wird im Spinatsystem die Ferredoxin-katalysierte pseudocyclische Photophosphorylierung fast vollständig gehemmt, die Ferredoxin-katalysierte cyclische Photophosphorylierung dagegen stimuliert (Tab. 4 in l.c.²⁵ und Abb. 3 in l.c.³). Auch in lyophilisierter, Lysozym-behandelter und extrahierter *Anacystis* stimuliert Ferredoxin die photosynthetische ATP-Bildung unter aeroben Bedingungen. Die Rate dieser photosynthetischen ATP-Bildung ist genauso hoch wie die der Ferredoxin-katalysierten cyclischen Photophosphorylierung (vgl. Abb. 2). Aus Tab. 4 geht die Empfindlichkeit der Ferredoxin-stimulierten photosynthetischen ATP-Bildung in Luft, der NADP-Reduktion und der Ferredoxin-katalysierten cyclischen Photophosphorylierung gegen DCMU hervor. 2,5 · 10⁻⁶ M DCMU hemmt die NADP-Reduktion vollständig, die Ferredoxin-katalysierte cyclische Photophosphorylierung überhaupt nicht und die Ferredoxin-stimulierte ATP-Bildung in Luft nur zu etwa 25 Prozent. Die Ferredoxin-stimulierte ATP-Bildung in Luft ist im *Anacystis*-System also nicht ebenso empfindlich gegen DCMU wie im Chloroplastensystem, und das deutet bereits darauf hin, daß in *Anacystis* auch unter aeroben Bedingungen der größte Teil des ATP aus der cyclischen Photophosphorylierung stammt.

Alle getesteten²⁶ pseudocyclischen Photophosphorylierungen in Chloroplasten erwiesen sich als MEHLER-Reaktionen²⁷. Bei einer Mehler-Reaktion wird ein photosynthetisch reduzierter Kofaktor unter H₂O₂-Bildung reoxidiert. Das gebildete H₂O₂

kann im Chloroplastensystem durch Hemmung der endogenen Katalase mit KCN²⁶ direkt gemessen werden. Auch bei der pseudocyclischen Photophosphorylierung mit Ferredoxin als Kofaktor wird in Chloroplasten H₂O₂ gebildet (Abb. 5 a). Nach Zu-

Abb. 5 a. Pseudocyclische Photophosphorylierung mit Ferredoxin als Kofaktor in Chloroplasten. Reaktionsbedingungen: 3 ml Reaktionsvolumen, P₁S₁ mit 0,2 mg Chl., pH 8,0, 15 Min. Licht bei 35000 Lux und 15 °C.

satz von 10⁻³ M KCN zum System werden genau so viele Äquivalente Sauerstoff aufgenommen wie ATP und wie H₂O₂ — in den Grenzen der H₂O₂-Bestimmungsmethode — gebildet werden. Im Gegensatz dazu läßt sich im *Anacystis*-System diese Stöchiometrie nicht feststellen. Denn in lyophilisierten, Lysozym-behandelten und extrahierten Algen sti-

²⁶ A. TREBST u. H. ECK, Z. Naturforschg. **16b**, 455 [1961].

²⁷ A. H. MEHLER, Arch. Biochem. Biophysics **33**, 65 [1951].

muliert Ferredoxin in Gegenwart von Kaliumcyanid nur die ATP-Bildung nicht aber die Sauerstoffaufnahme und die H_2O_2 -Bildung (Abb. 5 b). Aus diesem Befund wird es deutlich, daß in *Anacystis* selbst unter aeroben Bedingungen ATP nach Zusatz von Ferredoxin über den cyclischen Elektronentransport gebildet wird.

Abb. 5 b. Ferredoxin-stimulierte ATP-Bildung in Luft in *Anacystis*. Reaktionsbedingungen: 3 ml Reaktionsvolumen, Algen (R_2) mit 0,2 mg Chl., pH 7,0, 20 Min. Licht bei 35000 Lux und 25 °C.

Diskussion

Bereits früher^{6, 17} gelang in lyophilisierter und Lysozym-behandelter *Anacystis* der Nachweis aller wichtigen photosynthetischen Reaktionen, die in isolierten Chloroplasten bekannt geworden sind. So wurden in dem zellfreien System aus *Anacystis* eine photosynthetische Sauerstoffentwicklung im Ferricyanid- oder NADP-System mit gleichzeitiger ATP-Bildung und cyclische bzw. pseudocyclische Photophosphorylierungen mit verschiedenen artifiziellen Kofaktoren wie PMS oder Menadion beschrieben. In der Präparation läßt sich — wie hier berichtet wird — auch eine durch Ferredoxin katalysierte cyclische Photophosphorylierung nachweisen, die sich in ihren Eigenschaften erheblich von der Ferredoxin-katalysierten cyclischen Photophosphorylierung isolierter Chloroplasten unterscheidet. Wie bereits ausgeführt, läßt sich die Ferredoxin-katalysierte cyclische Photophosphorylierung isolierter Chloroplasten dann nachweisen, wenn sich die an

ihre beteiligten Kofaktoren in einem bestimmten, genau einzustellenden Redoxzustand befinden^{18, 19}. Dieses „poising“ spielt im *Anacystis*-System eine geringere Rolle, wie an der geringen Empfindlichkeit der Reaktion gegen DCMU gesehen werden kann. Während in den Versuchen mit „broken chloroplasts“ für die cyclische Photophosphorylierung es sich als günstig erwies, Rotlichtfilter zwischen der Lichtquelle und den Warburg-Gefäßen zu verwenden^{2, 10}, hemmt Weißlicht (ohne Filter) die ATP-Bildung in der Ferredoxin-katalysierten cyclischen Photophosphorylierung nicht; wegen der höheren Lichtintensitäten werden im Weißlicht sogar höhere Raten als im Rotlicht in der *Anacystis*-Präparation gemessen (vgl. l.c.¹⁰). Die Ferredoxin-katalysierten cyclischen Photophosphorylierungen in Chloroplasten und Blaualgen unterscheiden sich weiterhin in ihrem unterschiedlichen pH-Optimum und in ihrer Empfindlichkeit gegen Antimycin A. Vor allem aus der Antimycin-Hemmung der Ferredoxin-katalysierten cyclischen Photophosphorylierung werden wichtige Schlüsse gezogen. In isolierten Chloroplasten wird in einem bestimmten Konzentrationsbereich nur die Photophosphorylierung mit Ferredoxin nicht aber die mit anderen Kofaktoren von Antimycin gehemmt. In vivo sind von der Photophosphorylierung abhängige Reaktionen wie etwa die anaerobe, DCMU-unempfindliche und lichtabhängige Glucoseassimilation von Algen Antimycin-empfindlich²⁸. Daher wird aus der Antimycin-Wirkung geschlossen, daß Ferredoxin der Katalysator der cyclischen Photophosphorylierung in vivo ist². Da in der Elektronentransportkette der Mitochondrien Antimycin zwischen Cytochrom b und c hemmt, vermutet ARNON¹⁸ diese Kofaktoren (Cytochrom b_6 bzw. Cytochrom f der Chloroplasten) in der Elektronentransportkette der Ferredoxin-katalysierten cyclischen Photophosphorylierung. Die Blaualge *Anacystis* ist ein Beispiel, bei dem die Ferredoxin-katalysierte cyclische Photophosphorylierung nicht von Antimycin A gehemmt wird, obwohl in *Anacystis* Cytochrom b_6 und Cytochrom f nachgewiesen wurden^{29, 7}. Es ist daher unklar, welche Kofaktoren außer Ferredoxin an der cyclischen Photophosphorylierung sowohl der Blaualgen als auch der Chloroplasten beteiligt sind und was der Grund für die unterschiedliche Empfindlichkeit der Reaktionen gegen Antimycin ist. Nach IZAWA et al.²² soll die Hemmstelle von Antimycin sich nicht spezifisch lokalisieren lassen, sondern Antimycin soll immer dann

hemmen, wenn der Elektronentransport die Rate des Phosphorylierungssystems begrenzt. Wenn diese Behauptung richtig ist, könnte angenommen werden, daß im Gegensatz zum Chloroplastensystem in *Anacystis* der Elektronentransport in der Ferredoxin-katalysierten cyclischen Photophosphorylierung nicht limitierend ist. Darauf könnte die im Vergleich zur offenkettigen Photophosphorylierung höhere Rate in der Ferredoxin-katalysierten cyclischen Photophosphorylierung hindeuten. Allerdings stellt man bei stark limitierenden Lichtintensitäten und damit bei limitierendem Elektronenfluß keine Hemmung der Ferredoxin-katalysierten cyclischen Photophosphorylierung durch Antimycin fest, so daß die Unempfindlichkeit der Ferredoxin-katalysierten cyclischen Photophosphorylierung gegen Antimycin in *Anacystis* andere Ursachen haben muß.

Außer Antimycin A erwies sich unter den getesteten Hemmstoffen Disalicylidenpropandiamin als wichtig. Nach TREBST und BURBA²⁴ sind unter allen untersuchten nur die Ferredoxin-abhängigen Reaktionen wie die NADP- oder die Nitritreduktion empfindlich gegen DSPD; andere photosynthetische Reaktionen, insbesondere cyclische Photophosphorylierungen mit Menadion oder PMS als Kofaktoren werden nicht beeinflusst. Da DSPD in intakter *Chlorella* die photosynthetische CO₂-Fixierung wesentlich weniger beeinflusst als die lichtabhängige, DCMU unempfindliche, anaerobe Glucoseassimilation, vermuten die Autoren²⁴, daß DSPD ein spezifischer Hemmstoff der Ferredoxin-katalysierten cyclischen Photophosphorylierung ist. Wie aus den hier berichteten Ergebnissen hervorgeht, hemmt DSPD tatsächlich die Ferredoxin-katalysierten cyclischen Photophosphorylierungen sowohl in isolierten Chloroplasten als auch im *Anacystis*-System. Damit ist DSPD der zweite Hemmstoff — neben Antimycin in höheren Pflanzen — aus dessen Wirkung eindeutig gefolgert werden kann, daß Ferredoxin der Kofaktor der cyclischen Photophosphorylierung in vivo ist. Allerdings hemmt DSPD überraschenderweise weder die Ferredoxin-katalysierte pseudocyclische Photophosphorylierung in Chloroplasten noch die Ferredoxin-stimulierte ATP-Bildung in Luft im *Anacystis*-System. Die Hemm-

stelle des DSPD läßt sich damit nicht mehr eindeutig zwischen Pigmentsystem I und Ferredoxin (vgl. l.c.²⁴) festlegen. TREBST und BURBA²⁴ nehmen an, daß DSPD photosynthetisch reduziert wird und dadurch hemmt; es könnte weiter vermutet werden, daß unter aeroben Bedingungen die Reduktion von DSPD und damit die Hemmwirkung unterbleibt. Jedenfalls ist der Mechanismus der Hemmwirkung von DSPD noch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

In isolierten Chloroplasten ist die Sättigungskonzentration an Ferredoxin für die cyclische Photophosphorylierung etwa 10-mal höher als für die offenkettige Photophosphorylierung mit NADP als Elektronenakzeptor²¹. Es wird eingewendet, diese hohe Ferredoxin-Konzentration könne kaum physiologisch und damit Ferredoxin nicht der Kofaktor der cyclischen Photophosphorylierung in vivo sein³⁰. Lyophilisierte und Lysozym-behandelte Zellen von *Anacystis* enthalten sättigende Mengen an Ferredoxin für die NADP-Reduktion, nicht aber für die cyclische ATP-Bildung¹⁰. Nach der anschließenden Extraktion der Algen läßt sich auch eine Abhängigkeit der NADP-Reduktion von Ferredoxin zeigen, und zur Sättigung der cyclischen Photophosphorylierung werden etwa 6—8-mal mehr Ferredoxin als für die NADP-Reduktion benötigt. Obwohl also auch im *Anacystis*-System die Sättigungskonzentration an Ferredoxin für die cyclische Photophosphorylierung höher als für die NADP-Reduktion ist, sehen wir darin keinen Einwand gegen Ferredoxin als Kofaktor der cyclischen Photophosphorylierung in vivo. Denn einerseits ist nicht bekannt, mit welcher Rate überhaupt die cyclische Photophosphorylierung in vivo ablaufen muß, andererseits können über Gehalt an Ferredoxin in intakten Chloroplasten oder Algen keine Aussagen gemacht werden, da durch die Isolierung notwendigerweise die photosynthetischen Strukturen und Kofaktoren verdünnt werden. Außerdem sind die Sättigungskonzentrationen für die Kofaktoren der cyclischen Photophosphorylierungen mit PMS, DCPIP, FMN oder Menadion eher noch höher als für Ferredoxin (vgl. l.c.³⁰). Neben Ferredoxin käme noch Phytoflavin als Kofaktor der cyclischen Photophosphorylierung in

²⁸ O. KANDLER u. W. TANNER, Ber. dtsch. bot. Ges. **79**, 48 [1966].

²⁹ R. W. HOLTON u. J. MYERS, Science [Washington] **142**, 234 [1963].

³⁰ M. AVRON u. J. NEUMANN, in: Annual Rev. Plant Physiol. **19**, 137 [1968].

Blualgen in Frage, da Phytoflavin Ferredoxin in allen getesteten Reaktionen vollständig ersetzen kann, wie wir berichteten^{31, 32, 10}. Allerdings wird Phytoflavin nur unter Eisenmangelbedingungen gebildet^{31, 32}, so daß unter Normalbedingungen nur Ferredoxin Kofaktor der cyclischen Photophosphorylierung sein kann. In den vitro-Versuchen ersetzen sich Ferredoxin aus Spinat und aus *Anacystis* vollständig^{31, 33, 10}, obwohl im Ferredoxin aus *Anacystis* doppelt so viel Eisen wie labiler Schwefel enthalten sein soll³⁴.

Die Raten der Ferredoxin-katalysierten cyclischen Photophosphorylierung in Chloroplasten und in *Anacystis* können kaum miteinander verglichen werden, da sich in unseren Versuchen die Ferredoxin-katalysierte cyclische Photophosphorylierung in Chloroplasten nur bei limitierendem Licht messen ließ (vgl. l.c.¹⁰). Die Ferredoxin-katalysierte cyclische Photophosphorylierung in *Anacystis* wurde bei hohen, nicht limitierendem Licht gemessen, und die Rate ist in dem Reaktionsansatz mit dem vergleichsweise großen Reaktionsvolumen von 3 ml mit bis zu 80 μ Mol ATP/h/mg Chlorophyll beträchtlich. Im offenkettigen Elektronentransport mit NADP als Akzeptor ist in lyophilisierter und Lyso-

zym-behandelter *Anacystis* die ATP-Bildung geringer, dort ist das Verhältnis von NADPH₂- und ATP-Bildung nur 2:1, und es läßt sich keine Kopplung von ATP-Bildung und Elektronentransport zeigen¹⁰ (vgl. auch l.c.⁸). Es ist nicht auszuschließen, daß bei der Herstellung der Präparation aus *Anacystis* die Kopplung von ATP-Bildung und Elektronentransport verloren geht. Aus den geschilderten Versuchsbedingungen kann aber vermutet werden, daß das photosynthetisch zu bildende ATP in *Anacystis* im Vergleich zu dem der Chloroplasten höherer Pflanzen wesentlich mehr aus dem cyclischen als aus dem offenkettigen Elektronentransport angeliefert wird. Die gut entwickelte und stabile cyclische Photophosphorylierung in Blualgen erinnert an die Verhältnisse in phototrophen Bakterien, dagegen sind die Elektronencarrier der photosynthetischen Reaktionen in Blualgen weitgehend ähnlich wie in höheren Pflanzen, wie aus den Arbeiten mit Blualgen-Präparationen übereinstimmend hervorgeht.

Herrn Professor Dr. A. TREBST danke ich für viele helfende Diskussionen, und der Deutschen Forschungsgemeinschaft bin ich für die Unterstützung der Arbeit durch Sachbeihilfen dankbar.

³¹ A. TREBST u. H. BOTHE, Ber. dtsch. bot. Ges. **79**, 44 [1966].

³² H. BOTHE, International Congress of Photosynthesis Research, Freudenstadt 1968, im Druck.

³³ M. C. W. EVANS, D. O. HALL, H. BOTHE u. F. R. WHATLEY, Biochem. J. **110**, 485 [1968].

³⁴ T. YAMANAKA, S. TAKAENAMI, K. WADA u. K. OKUNUKI, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **180**, 196 [1969].