

Beziehungen zwischen Carboanhydraseaktivität und Aufnahme von HCO_3^- und Cl^- bei der Photosynthese von *Scenedesmus obliquus*

Günter R. Findenegg

Fachbereich Biologie, Botanik, Technische Hochschule Darmstadt,
D-6100 Darmstadt, Schnittspahnstr. 3—5, Federal Republic of Germany

Eingegangen am 3. Dezember 1973

Relations between Carbonic Anhydrase Activity and Uptake of HCO_3^- and Cl^- in Photosynthesis by *Scenedesmus obliquus*

Summary. Synchronized, young cells of *Scenedesmus obliquus* when adapted to air plus 1.5% CO_2 have only about $\frac{1}{20}$ of the carbonic anhydrase activity of air-adapted cells. At pH 9.2 (where HCO_3^- is the prevailing form of inorganic carbon) such cultures do not evolve much O_2 at $50 \cdot 10^3$ lux, in contrast to air-adapted cells. In contrast, at pH 5.8 (where CO_2 prevails) there is not much difference in O_2 evolution rate between cultures adapted to different CO_2 -levels. It is concluded that carbonic anhydrase activity is necessary for the utilisation of HCO_3^- but not of CO_2 in photosynthesis by *Scenedesmus*.

Air-adapted cells take up about 0.3 $\mu\text{moles Cl}^-/\text{g FW}$ from 0.1 mM KCl solution (pH 5.8) within the first minute of illumination. The same amount is released when the light is switched off. The light induced Cl^- -uptake is inhibited by addition of HCO_3^- or high pH, and may be interpreted as an alternative uptake of Cl^- instead of HCO_3^- .

As cells adapted to air plus 1.5% CO_2 do not show this light induced Cl^- -uptake and as the inhibitor of carbonic anhydrase, diamox, affects Cl^- -uptake of air-adapted cells, it is suggested that carbonic anhydrase may be involved in the uptake of Cl^- and HCO_3^- .

Einleitung

Das Enzym Carboanhydrase (E.C. 4.2.1.1.), das die Hydratisierung von CO_2 katalysiert, ist in photosynthetischen Zellen weit verbreitet (Waygood, 1955). Hemmung seiner Aktivität durch spezifische Inhibitoren (Everson, 1969) oder Deadaptation (Reed und Graham, 1968) vermindert die Photosynthesegeschwindigkeit.

Nimmt man an, daß der Kohlenstoff in photosynthetisierende Zellen als freies CO_2 , das unmittelbare Substrat der Ribulose-1,5-diphosphat-carboxylase (Cooper *et al.*, 1969), eindringt, so ist die Rolle der Carboanhydrase schwer verständlich, da keine Umwandlung in HCO_3^- nötig ist. Man hat daher auf die diffusionsbeschleunigende Wirkung dieses Enzyms für CO_2 und HCO_3^- (Enns, 1967), aber auch auf die Möglichkeit

hingewiesen, daß es durch lokale Erhöhung der CO_2 -Konzentration die Carboxylierung des Ribulose-1,5-diphosphates beschleunigen könnte (Werdan und Heldt, 1972).

Einige Pflanzen können jedoch neben CO_2 auch im Außenmedium verfügbares HCO_3^- für die Photosynthese verwenden (s. Raven, 1970), darunter *Scenedesmus* (Österlind, 1950; Hess *et al.*, 1967). Es erscheint sinnvoll, zu untersuchen, ob diese Fähigkeit von der Carboanhydraseaktivität abhängt. Eine solche Untersuchung wird durch die Beobachtung von Reed und Graham (1968) ermöglicht, wonach Adaptation von Grünalgen an erhöhte CO_2 -Konzentrationen eine Verminderung der Carboanhydraseaktivität bewirkt.

Vorversuche mit *Scenedesmus*kulturen, die an 0,03 bzw. 1,5% CO_2 adaptiert waren, ergaben, daß bei erniedrigtem Carboanhydrasespiegel die lichtinduzierte Cl^- -Aufnahme spezifisch gehemmt ist. In dieser Arbeit wird über das unterschiedliche Verhalten von *Scenedesmus*-kulturen mit hohem bzw. niedrigem Carboanhydrasespiegel gegenüber Cl^- und HCO_3^- berichtet.

Material und Methoden

Synchronkulturen von *Scenedesmus obliquus* (Stamm D3) wurden bei 30°C mit Luft +1,5% CO_2 begast und abwechselnd 16 h mit $20 \cdot 10^3$ lux beleuchtet und 8 h verdunkelt. Zu Beginn jeder Lichtperiode wurden sie mit frischer Knopscher Nährlösung (Cl^- -frei; Fe-EDTA-Komplex statt FeSO_4 , siehe Ruppel, 1962; 4 Tropfen/l Hoagland A—Z Spurenelementlösung zugefügt) auf $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml verdünnt. Die Algen verzehnfachen etwa ihre Zellzahl pro Tag und teilten sich vor Lichtbeginn.

„ CO_2 -adaptierte“ Algen wurden 7 h nach der Verdünnung direkt, „luftadaptierte“ Algen zum gleichen Zeitpunkt aber nach 2 h Belüftung mit Normalluft (0,03% CO_2) erhalten. CO_2 -adaptierte Algen nehmen innerhalb der 2. Versuchsstunde die Eigenschaften luftadaptierter Algen an. Die Versuche wurden daher stets auf 1 h begrenzt.

Die Versuche wurden nach der Durchflußmethode (Findenegg *et al.*, 1971) durchgeführt. Mit ihrer Hilfe können kurzzeitige Stoffaufnahme- bzw. -abgabephasen empfindlicher und mit besserer zeitlicher Auflösung registriert werden als mit der üblichen Gefäßmethode. Außerdem werden diese Änderungen bei konstanter Zusammensetzung des die Algen umgebenden Mediums gemessen, da dieses ständig erneuert wird.

Vor dem Versuch wurden die Algen mit einer peristaltischen Pumpe in die luftblasenfrei mit Versuchslösung gefüllte Algenkammer des umgedrehten Versuchsgefäßes (Abb. 1) gepumpt. Sie verteilten sich über dem dort eingespannten Membranfilter (Porengröße 8,0 μm) gleichmäßig. Anschließend wurde Versuchslösung (je nach gewünschtem pH-Wert 5 mM MES, HEPES bzw. Glycin; 2 mM NaOH und Zusätze) nachgepumpt (2,8 ml/min), das Gefäß in seine normale Lage gebracht und die Meßelektroden von oben direkt auf den Membranfilter aufgesetzt. Die strömende Versuchslösung preßte nun die Algen nach oben gegen den Filter und wurde unmittelbar nach ihrem Durchtritt durch Algen und Filter von den Elektroden analysiert (O_2 -Elektrode: Yellow Springs Instruments, stabförmig; Cl^- -Elektrode: Metrohm EA 306/Cl). Ein Licht-Dunkel-Wechsel (Beleuchtungs-

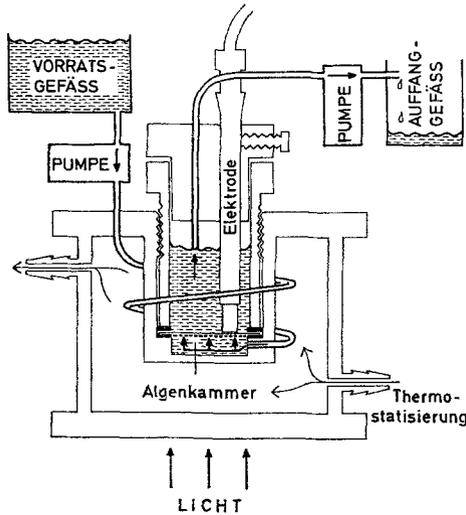


Abb. 1. Versuchsgefäß

stärke $50 \cdot 10^3$ lux) im Versuch machte sich mit etwa 10 s Verzögerungszeit an den Elektroden bzw. in den registrierten Kurven bemerkbar. Bei den Versuchen über die Cl^- -Aufnahme wurden etwa 100 mg Frischgewicht Algen (entsprechend $500 \mu\text{g}$ Chlorophyll) eingesetzt. Um Bläschenabscheidung im Elektrodenraum zu verhindern, wurde die Versuchslösung vor dem Versuch kurz an der Wasserstrahlpumpe entlüftet. Bei den Versuchen über die HCO_3^- -Verwertung (10 mg Frischgewicht Algen) wurde sie statt dessen bei 35°C 1 h mit CO_2 -freier Luft gespült und anschließend für 1 min mit Luft + 4% CO_2 begast. Eine weitere Zugabe von CO_2 zur Versuchslösung bewirkte weder bei hohem noch bei niedrigem pH-Wert eine Steigerung der O_2 -Entwicklung der Algen.

Zur Messung der Carboanhydraseaktivität wurden die Algen (etwa 1 g Frischgewicht) aus 1 l Nährlösung abzentrifugiert, mit kaltem 0,05 M Na-phosphatpuffer + 5 mM Cystein (pH 8,3) gewaschen und in 25 ml des gleichen Mediums in einem Braun-Zellhomogenisator (Typ 2876) 1 min unter Kühlung homogenisiert, wobei die meisten Zellen zerstört wurden und die Temperatur nicht über 15°C anstieg. Zur Aktivitätsbestimmung (vgl. Carter, 1972) wurden zu 2 ml Homogenisiermedium bzw. Algenhomogenat (2°C) 2 ml CO_2 -gesättigtes Wasser (0°C) zugefügt und die Geschwindigkeit der pH-Änderung registriert. Im gekochten Homogenat änderte sich der pH-Wert gleich schnell wie im Homogenisiermedium, d.h. die homogenisierten Algen veränderten die Pufferkapazität nicht nennenswert.

Ergebnisse

Carboanhydraseaktivität. „Luft-“ und „ CO_2 -adaptierte“ Algen wurden auf die Aktivität der Carboanhydrase hin untersucht. Tabelle 1 zeigt, daß $1/20$ des Homogenates luftadaptierter Algen die Wirkung wie Homogenat CO_2 -adaptierter Algen hat. Luftadaptierte Algen weisen demnach gegenüber CO_2 -adaptierten die 20fache Carboanhydraseaktivität auf.

Tabelle 1. Carboanhydraseaktivität: Dauer der durch Zusatz von CO_2 zu 2 ml Homogenisiermedium bzw. Algenhomogenat hervorgerufenen pH-Änderung zwischen pH 7,8 und 7,3. Kontrolle 65 ($\pm 0,12$)

	Homogenat (ml)	CO_2 -adaptiert (s)	Luftadaptiert (s)
Gekocht	2,0	65	64
Ungekocht	2,0	61	34
	1,0		43
	0,5		50
	0,2		57
	0,1		60

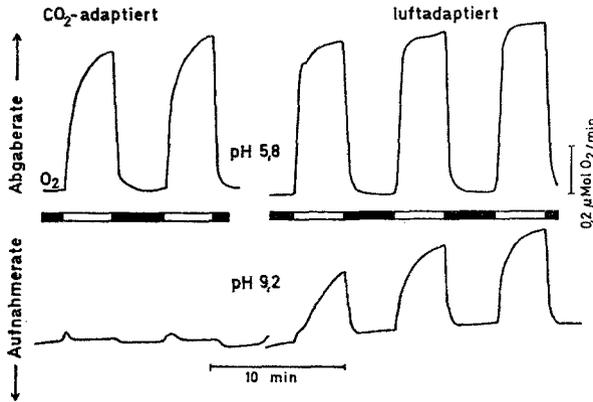


Abb. 2 Sauerstoffentwicklung bzw. -verbrauch von *Scenedesmus* beim Licht-Dunkel-Wechsel. pH 5,8: MES-NaOH; pH 9,2 Glycin-NaOH; 25°C; CO_2 bzw. HCO_3^- -im Überschuß vorhanden

Sauerstoffentwicklung. Um zwischen CO_2 - und HCO_3^- -Verwertung unterscheiden zu können, wurde die Rate der photosynthetischen O_2 -Entwicklung bei Überangebot von CO_2 bzw. HCO_3^- bei hohem und niedrigem pH-Wert verglichen. Starke O_2 -Entwicklung im Licht bei pH 9 läßt auf gute Verwertung von HCO_3^- in der Photosynthese schließen.

Abb. 2 zeigt, daß CO_2 -adaptierte Zellen im Gegensatz zu luftadaptierten bei pH 9 im Licht kaum O_2 entwickeln, also kaum HCO_3^- verwerten können. Hingegen besteht im Licht-Dunkel-Unterschied der O_2 -Bilanz bei pH 5,8 am Ende der letzten Lichtperiode kein Unterschied zwischen luft- und CO_2 -adaptierten Algen. Die Geschwindigkeit der Photosynthese ist in diesem Fall nach kurzer Induktionszeit bei den an höhere CO_2 -Konzentrationen adaptierten Algen nicht geringer als bei luftadaptierten Algen.

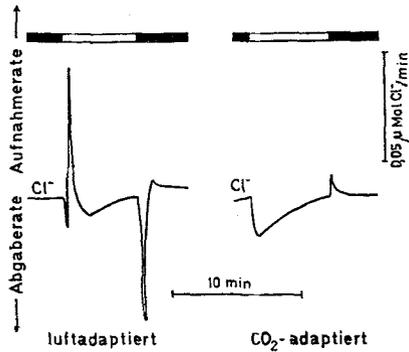


Abb. 3. Chloridaufnahme bzw. -abgabe von *Scenedesmus* beim Licht-Dunkel-Wechsel. MES-NaOH, pH 5,8; 25°C; KCl 0,1 mM

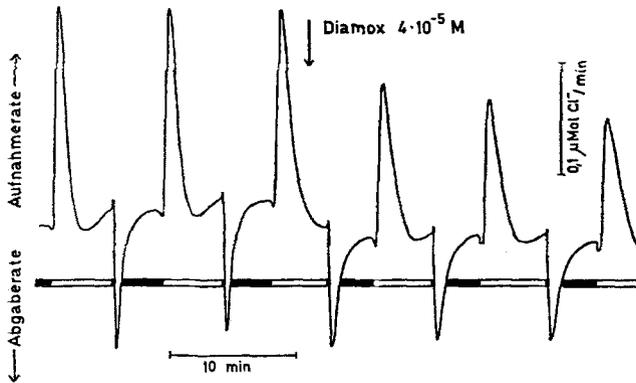


Abb. 4. Wirkung eines Carboanhydraseinhibitors auf die Chloridaufnahme bzw. -abgabe luftadaptierter *Scenedesmus*zellen beim Licht-Dunkel-Wechsel. MES-NaOH, pH 5,8; 25°C; KCl 0,1 mM

Chloridtransport. Abb. 3 zeigt die Cl⁻-Aufnahme bzw. -Abgabe von luft- und CO₂-adaptierten Kulturen beim Licht-Dunkel-Wechsel. Nur luftadaptierte Zellen nehmen nach Lichtbeginn etwa 0,3 μMol Cl⁻/g Frischgewicht auf, die nach Verdunkelung wieder abgegeben werden. Die bei CO₂-adaptierten Algen registrierte und auch bei luftadaptierten Algen angedeutete „Cl⁻-Abgabe“ nach Lichtbeginn wird teilweise durch einen direkten Lichteffect auf die Cl⁻-sensitive Elektrode, also durch einen rein physikalischen Vorgang, vorgetäuscht.

Folgende Befunde sprechen dafür, daß die lichtabhängige Cl⁻-Aufnahme luftadaptierter Algen bei erhöhter HCO₃⁻-Konzentration vermindert ist: Zusatz von 0,1 mM KHCO₃ zur Versuchslösung (pH 7,1)

vermindert die nach Lichteinschalten aufgenommene Cl⁻-Menge um 20%; bei pH 5,8 ist die aufgenommene Cl⁻-Menge ohne besonderen Zusatz an HCO₃⁻ um 40% größer als bei pH 7,1.

Den Einfluß des Carboanhydraseinhibitors Diamox (2-Acetylamino-1,3,4-thiadiazol-5-sulfonamid; Acetazolamid) auf den Cl⁻-Transport zeigt Abb. 4. Diamox verlangsamt die Cl⁻-Aufnahme (Absinken der Grundlinie) und verzögert die lichtinduzierte Aufnahme bzw. die Abgabe bei Lichtausschalten (weniger scharfe peaks).

Da Diamox unter bestimmten Bedingungen auch Photosystem II hemmt (Swader und Jacobson, 1972), wurde im gleichen Versuch die Geschwindigkeit der O₂-Entwicklung zu Lichtbeginn gemessen. Sie änderte sich nach Zusatz von Diamox um weniger als 3%.

Diskussion

Die Aktivität der Carboanhydrase ist bei CO₂-adaptierten *Scenedesmus*-kulturen erniedrigt. Das entspricht dem von Reed und Graham (1968) an *Chlorella* und dem an *Chlamydomonas* (Nelson *et al.*, 1969) gefundenen Verhalten. Werden CO₂-adaptierte Kulturen mit Normalluft begast, so steigt der Carboanhydrasespiegel wie bei *Chlorella* (Graham *et al.*, 1971) rasch an, so daß die Algen nach 2 h in ihren Photosyntheseigenschaften bereits umgestellt sind.

Die bisherigen Vorstellungen über die Funktion der Carboanhydrase beruhen meist auf Hemmstoffversuchen. Solche Experimente bei variiertem pH-Wert führen zu der Annahme, daß dieses Enzym nur zur photosynthetischen HCO₃⁻-Verwertung, aber nicht zur CO₂-Fixierung nötig ist; dabei mußte allerdings versucht werden, die bei verschiedenem pH-Wert unterschiedliche Inhibitorwirkung auszugleichen. Österlind (1952) zeigte an *Scenedesmus*, daß Cyanid, ein starker Inhibitor der Carboanhydrase (Waygood, 1955), die Photosynthese stärker hemmte, wenn HCO₃⁻ statt CO₂ die Kohlenstoffquelle war; Raven (1970) kam an *Hydrodictyon*, Ikemori und Nishida (1968) kamen an *Ulva* zum gleichen Ergebnis. Die vorliegenden Versuche über die O₂-Entwicklung luft- und CO₂-adaptierter Algen (Abb. 2) bestätigen diese Annahme.

In Spinatchloroplasten, in denen das Enzym durch Diamox vollständig gehemmt war, lief die Photosynthese immer noch mit halber Geschwindigkeit ab (Everson, 1969). Dies ist erklärbar, wenn die Carboanhydrase nur für die HCO₃⁻-Verwertung nötig ist.

Ebenso auffallend wie die unterschiedliche O₂-Entwicklung luft- und CO₂-adaptierter Algen bei pH 9,2 ist ihre unterschiedliche Cl⁻-Aufnahme zu Lichtbeginn bei pH 5,8. Auch über den Zusammenhang von Carboanhydrase und Cl⁻-Transport liegen, besonders an tierischen (s. Carter, 1972), aber auch an pflanzlichen Objekten, Hemmstoffversuche vor. So

wie hier Diamox den Cl^- -Transport beeinflusst (Abb. 4), hemmte Sulfanilamid den Cl^- -Transport von *Hydrodictyon* (Raven, 1970) und Na-azid den Cl^- -Transport von *Scenedesmus*, und zwar viel stärker als die Atmung, weshalb anhand dieser Ergebnisse eine direkte Hemmung des Cl^- -Transportes durch das Azid vermutet wurde (Hope *et al.*, 1974). Azid ist als Carboanhydrasehemmstoff bekannt (Waygood, 1955). In nicht photosynthetischen Pflanzenteilen wie Karottengewebescheiben ist keine Carboanhydraseaktivität zu erwarten. Dort hemmt Diamox den Cl^- -Transport nicht (Cram 1973).

Trotzdem wurde angezweifelt, ob der Cl^- -Transport wirklich von der Carboanhydrase abhängt, besonders als gefunden wurde, daß Carboanhydrase-hemmende Sulfonamide den Cl^- -Transport auch in solchen tierischen Geweben hemmen, in denen keine Carboanhydraseaktivität gemessen werden konnte (Kitahara *et al.*, 1967). Das Fehlen lichtinduzierter Cl^- -Aufnahme bei CO_2 -adaptierten Algen (Abb. 3) zeigt erstmals unabhängig von irgendwelchen Hemmstoffen eine Korrelation zwischen Carboanhydraseaktivität und Cl^- -Transport.

Luftadaptierte Algen nehmen nach Lichteinschalten dann viel Cl^- auf, wenn das äußere Substrat der Photosynthese CO_2 ist und kaum HCO_3^- zur Aufnahme verfügbar ist, nämlich bei pH 5,8. Das legt die Annahme nahe, daß Cl^- in diesem Falle als „Ersatz“ für HCO_3^- aufgenommen wird. Damit stimmt überein, daß bei pH 7,1 die Cl^- -Aufnahme bei Lichtbeginn durch Erhöhung der HCO_3^- -Konzentration vermindert werden kann.

Hemmung der Cl^- -Aufnahme durch HCO_3^- wurde an roten Blutkörperchen (Gunn *et al.*, 1973), aber auch an *Vallisneria* (van Lookeren-Campagne, 1957) und *Hydrodictyon* (Raven, 1968) gefunden. Wenn man annimmt, daß luftadaptierte Zellen Cl^- anstelle von HCO_3^- aufnehmen, ist zunächst unklar, warum die Nettoaufnahme an Cl^- nur etwa 1 min andauert, während die HCO_3^- -Aufnahme und -Assimilation während der ganzen Lichtperiode andauert, wie sich aus der stetigen O_2 -Entwicklung (Abb. 2) ergibt. Nimmt man an, daß das Cl^- in den Algen gleichmäßig verteilt ist, so ist zu folgern, daß die Cl^- -Konzentration im Inneren beim Lichteinschalten um 0,3 mMol/l steigt; das ist dreimal so viel wie die Konzentration im Medium. Das dadurch bedingte schnelle Ansteigen des Cl^- -Effluxes kann das rasche Abklingen der Nettoaufnahme an Cl^- bewirken.

Der Ausfall lichtinduzierter Cl^- -Aufnahme bei CO_2 -adaptierten Algen (Abb. 2) bedeutet, wenn Cl^- von luftadaptierten Algen als HCO_3^- -Ersatz aufgenommen wird, auch den Ausfall lichtinduzierter HCO_3^- -Aufnahme bei diesen Algen. Dies läßt auf eine Beteiligung der Carboanhydrase am Transport von Cl^- und HCO_3^- schließen. Eine solche Beteiligung schließt

aber nicht aus, daß das Enzym außerdem, vielleicht auch während des Transportvorganges, die Spaltung des HCO_3^- katalysiert.

Diese Arbeit wurde durch eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Professor Dr. U. Lüttge und Professor Dr. W. Ullrich danke ich für die Durchsicht des Manuskriptes.

Literatur

- Carter, M. J.: Carbonic anhydrase: isoenzymes, properties, distribution, and functional significance. *Biol. Rev.* **47**, 465—513 (1972)
- Cooper, T. G., Filmer, D., Wishnik, M., Lane, D. M.: The active species of 'CO₂' utilized by ribulose diphosphate carboxylase. *J. biol. Chem.* **244**, 1082—1083 (1969)
- Cram, W. J.: Internal factors regulating nitrate and chloride influx in plant cells. *J. exp. Bot.* **24**, 328—341 (1973)
- Enns, T.: Facilitation by carbonic anhydrase of carbon dioxide transport. *Science* **155**, 44—47 (1967)
- Everson, R. G.: Bicarbonate equilibria and the apparent K_M (HCO_3^-) of isolated chloroplasts. *Nature (Lond.)* **222**, 876 (1969)
- Findenegg, G. R., Paschinger, H., Broda, E.: Untersuchung der Lichtabhängigkeit der Aufnahme von Rubidium, Zink, Kobalt, Blei und Cer durch *Chlorella* nach einer Flußmethode. *Planta (Berl.)* **99**, 163—173 (1971)
- Graham, D., Atkins, C. A., Reed, M. L., Patterson, B. D., Smillie, R. M.: Carbonic anhydrase, photosynthesis, and light-induced pH-changes. In: *Photosynthesis and photorespiration*, ed. by Hatch, Osmond and Slater, p. 267—274. New York-London-Sydney-Toronto: Wiley-Interscience 1971
- Gunn, R. B., Dalmark, M., Tosteson, D. C., Wieth, J. O.: Characteristics of chloride transport in human red blood cells. *J. gen. Physiol.* **61**, 185—206 (1973)
- Hess, J. L., Tolbert, N. E., Pike, L. M.: Glycollate biosynthesis by *Scenedesmus* and *Chlorella* in the presence or absence of NaHCO_3 . *Planta (Berl.)* **74**, 278—285 (1967)
- Hope, A. B., Lüttge, U., Ball, E.: Chloride uptake in strains of *Scenedesmus obliquus*. *Z. Pflanzenphysiol.*, im Druck (1974)
- Ikemori, M., Nishida, K.: Carbonic anhydrase in the marine alga *Ulva pertusa*. *Physiol. Plantarum (Cph.)* **21**, 292—297 (1968)
- Kitahara, S., Fox, K. R., Hogben, C. A. M.: Depression of chloride transport by carbonic anhydrase inhibitors in the absence of carbonic anhydrase. *Nature (Lond.)* **214**, 836—837 (1967)
- Lookeren Campagne, R. N. van: Light-dependent chloride absorption in *Vallisneria* leaves. *Acta bot. neerl.* **6**, 543—582 (1957)
- Nelson, E. B., Cenedella, A., Tolbert, N. E.: Carbonic anhydrase levels in *Chlamydomonas*. *Phytochemistry* **8**, 2305—2306 (1969)
- Österlind, S.: Inorganic carbon sources of green algae. I. Growth experiments with *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Physiol. Plantarum (Cph.)* **3**, 353—360 (1950)
- Österlind, S.: Inorganic carbon sources of green algae. V. Inhibition of photosynthesis by cyanide. *Physiol. Plantarum (Cph.)* **5**, 372—378 (1952)
- Raven, J. A.: The mechanism of photosynthetic use of bicarbonate by *Hydrodictyon africanum*. *J. exp. Bot.* **19**, 193—206 (1968)
- Raven, J. A.: Exogenous inorganic carbon sources in plant photosynthesis. *Biol. Rev.* **45**, 167—221 (1970)

- Reed, M. L., Graham, D.: Control of photosynthetic carbon dioxide fixation during an induction phase in *Chlorella*. *Plant Physiol.* **43**, Suppl. 29 (1968)
- Ruppel, H. G.: Untersuchungen über die Zusammensetzung von *Chlorella* bei Synchronisation im Licht-Dunkel-Wechsel. *Flora (Jena)* **152**, 113—138 (1962)
- Swader, J. A., Jacobson, B. S.: Acetazolamide inhibition of photosystem II in isolated spinach chloroplasts. *Phytochemistry* **11**, 65—70 (1972)
- Waygood, E. R.: Carbonic anhydrase (plant and animal). In: *Methods in enzymology*, ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan, vol. II, p. 836—846. New York: Academic Press 1955
- Werdan, K., Heldt, H. W.: Accumulation of bicarbonate in intact chloroplasts following a pH gradient. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **283**, 430—441 (1972)