

## Lichtbedingte Veränderungen des ATP-Spiegels einer chlorophyllfreien *Chlorella*-Mutante

Wolfgang Kowallik und Irmgard Scheil

Botanisches Institut der Universität, Gyrhofstr. 15, D-5000 Köln, Federal Republic of Germany

### Changes in ATP-Concentration by Light in a Chlorophyll-Free *Chlorella* Mutant

**Summary.** The total amount of adenine nucleotides was not changed when non-growing cells of a chlorophyll-free, carotenoid-containing mutant of *Chlorella vulgaris* Beijerinck (211-11 h/20) were transferred from darkness into blue light ( $\lambda < 550$  nm,  $\sim 300 \mu\text{W cm}^{-2}$ ). However the level of ATP increased significantly immediately after the onset of blue illumination, while that of both ADP and AMP decreased (Table 1). Induction period, intensity dependency and wavelength dependency of the light-induced change in ATP-concentration (Figs. 1–3) resemble those of the long-known enhancement of respiration by blue light. The observed *increase* in ATP does not support the often proposed idea of enhanced carbohydrate breakdown being the result of a reduced ATP-level, but rather seems to arise from enhanced substrate degradation.

### Einleitung

Der Abbau endogener Kohlenhydratreserven ist sowohl bei grünen als auch chlorophyllfreien Stämmen der einzelligen Grünalge *Chlorella* durch Belichtung mit kurzwellig-sichtbarer Strahlung beträchtlich zu intensivieren (Kowallik und Gaffron, 1966; Laudenbach und Pirson, 1969). Wellenlängen-,  $\text{O}_2$ -, Temperatur- und Hemmstoffabhängigkeit des Abbaus im Licht (Kowallik, 1971) sprechen trotz des Vorhandenseins von microbodies (Codd et al., 1973) und aktiver Glykolatoxidase (Kowallik und Schmid, 1971) nicht für ein Umschalten auf Photorespiration, lassen

*Abkürzungen:* TCE=Trichloressigsäure; gZ=gepacktes Zellvolumen

— insbesondere wegen der darüberhinaus beobachteten identischen Abbauprodukte exogener [ $^{14}\text{C}$ ]Glucose im Dunkel und im Blau (Georgi, 1974) — vielmehr eine Beschleunigung der Dunkelatmung vermuten. Eine solche könnte wegen der auch für pflanzliches Material nachgewiesenen regulativen Einflüsse von Adeninnucleotiden auf Glykolyseenzyme (s. Turner und Turner, 1975) beispielsweise durch Erniedrigung des ATP-Spiegels der Zelle zustande kommen. Wir haben diese Möglichkeit überprüft und teilen die Ergebnisse im vorliegenden mit.

### Material und Methodik

Versuchsobjekt war eine chlorophyllfreie, carotinoidhaltige Mutante von *Chlorella vulgaris* Beijerinck, 211-11 h/20 der Algen Sammlung des Pflanzenphysiologischen Instituts Göttingen. Ihre Stammkulturen wurden auf Nähragar + 0,5% Glucose bei  $16^\circ\text{C}$  im Dunkeln gehalten, die für die Versuche benötigten Zellen in Flüssigkeit (anorganische Nährlösung + 1% Glucose) unter kontinuierlicher Luftbegasung bei  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  im Dunkeln herangezogen (Kowallik, 1962).

Für die Experimente wurden Zellen aus 10–14 d alten Kulturen am Vorabend auf der Zentrifuge vom Nährmedium abgeschleudert, dreimal mit dest. Wasser gewaschen, in 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,5 oder — wenn neben ATP auch ADP und AMP bestimmt werden sollten — in 0,1 M Triäthanolaminpuffer pH 7,5 zu einer Dichte von rund  $70 \mu\text{gZ/ml}$  Suspension resuspendiert und in Erlenmeyerkolben über Nacht bei  $30 \pm 0,1^\circ\text{C}$  im Dunkeln in einer vom Boden beleuchtbaren Warburgwanne mit 90 Ausschlägen/min geschüttelt. Anderntags wurden zur gewünschten Zeit Proben rasch in Zentrifugengläser pipettiert, die soviel 60%ige TCE enthielten, daß eine Endkonzentration von 6% resultierte. Fünfminütiges Schütteln bei Raumtemperatur führte zu erschöpfender möglicher Extraktion der Zelladenylate, die nach Abtrennen des Sediments (2 min bei 5000 U/min) und Einstellen des Extrakts auf pH 8,0 mittels käuflicher Testkombinationen von Boehringer, Mannheim (Jaworek et al., 1974) im Überstand bestimmt wurden.

Die Zuverlässigkeit des ATP-Tests überprüften wir durch Einsatz ATP-spaltender Enzyme: 5minütige Inkubation des TCE-Extrakts einer Algenprobe mit ATPase (Sigma, A-7510) oder Apyrase (Sigma, A-6132) führte im anschließenden Test zu einer Extinktionsdifferenz von weniger als 10% derjenigen einer Kontrollmessung.

Als Quelle für Blaulicht dienten entweder 4 unter dem Glasboden der Warburgwanne angebrachte Quecksilberhochdrucklampen (Philips HPL, je 250 W) oder eine Xenonlampe (Osram XBO, 450 W/P), deren Strahlung durch den Wannenboden in die Versuchsgefäße gespiegelt wurde. Im ersten Fall befand sich ein blaues Plexiglasfilter (Transmission =  $\lambda < 550$  nm, max. um 450 nm, Roehm und Haas, Darmstadt), im zweiten standen Interferenzfilter (Typ IL, HB = 10–14 nm, Schott und Gen., Mainz) im Strahlengang. Die Lichtintensität wurde durch Verändern des Lampenabstandes und den Einsatz von Graugläsern (Typ NG 5, 1–5 mm, Schott und Gen., Mainz) reguliert. Zur Energiemessung benutzten wir Thermosäule (CA 1) und Spiegelgalvanometer (A 54) von Kipp und Zonen, Holland.

Das gepackte Zellvolumen wurde in Hämatokritröhrchen nach Hamburger durch 10minütige Zentrifugation bei 2200 g bestimmt.

Statistische Auswertung erfolgte nach Pätou (1943).

## Ergebnisse

Ruhende, in 0.1 M Triäthanolaminpuffer pH 7,5 suspendierte Zellen der chlorophyllfreien, carotinoidhaltigen Mutante Nr. 20 von *Chlorella vulgaris* weisen im Dunkel einen ATP-Gehalt von 0,45 nmol/ $\mu$ l gZ auf. Da ein  $\mu$ l Zellsediment bei rund 250  $\mu$ g Trockenmasse etwa  $1,2 \times 10^7$  Zellen enthält, ergibt das für 1 mg Trockenmasse einen Gehalt von rund 2 nmol ATP, für die Einzelzelle einen solchen von  $3,5 - 4,0 \times 10^{-17}$  mol. Diese Werte stimmen mit älteren Angaben für grüne Chlorellen (Syrett, 1958; Tomova et al., 1971), *Ankistrodesmus* (Urbach und Kaiser, 1972) und *Chlamydomonas* (Steup und Pirson, 1974) gut überein. Im Laufe mehrerer Meßstunden bleibt der ATP-Spiegel bei gleichzeitigem respiratorischem  $O_2$ -Verbrauch von rund  $1 \times 10^{-8}$  mol/h und  $\mu$ l gZ konstant.

Im Blaulicht ( $\lambda < 550$  nm), das nach etwa 10minütiger Anlaufzeit zu einer über Stunden gleichbleibenden Erhöhung des Atmungs-gaswechsels auf  $3 - 4 \times 10^{-8}$  mol  $O_2$ -Verbrauch/h und  $\mu$ l gZ führt (Kowallik und Gaffron, 1966; Kowallik und Kirst, 1975), ist der ATP-Spiegel auf 0,70 nmol/ $\mu$ l gZ und damit auf 156% desjenigen der Dunkelkontrolle erhöht.

Dieser Steigerung entspricht ein Abfall im ADP und AMP-Gehalt, so daß der Gesamtadenylat Spiegel gleich bleibt (Tabelle 1). Die ATP-Zunahme beruht

danach nicht auf einer Adenylatkinase-katalysierten Übertragung energiereicher Phosphatgruppen innerhalb des Adenylatsystems, sie kommt vielmehr durch Neubildung energiereicher Phosphatbindungen zustande. Letzteres ist auch anhand der nach Atkinson und Walton (1967) als  $([ATP] + 1/2[ADP])/([ATP] + [ADP] + [AMP])$  ausgedrückten Energieladung der Zelle zu erkennen: sie steigt von 0,57 im Dunkel auf 0,68 im Blau.

Die lichtbedingte Erhöhung des ATP-Spiegels ist schon nach kurzer Bestrahlungsdauer faßbar. Im dargestellten Beispiel der Abbildung 1 reichte eine nur 2minütige Blaubelichtung aus, um ihn um rund 8% über denjenigen der Dunkelkontrolle anzuheben. Vier Minuten Blaulicht führten zu 17%, 15 min zu 32% und 30 min zu rund 40% Steigerung über den Dunkelwert und damit zu einem Spiegel, der auch bei noch längerer Lichteinwirkung nur geringfügig weiter erhöht wurde.

Den Energiebedarf der lichtbedingten ATP-Zunahme bestimmten wir für Blaulicht der Schwerpunktwellenlänge 455 nm (HB 13 nm). Die dabei zu etwa Halbsättigung führende relative Energie 5 entspricht ohne Berücksichtigung des Reflexions- und Absorptionsverlustes durch Spiegel und Wasserbad  $5 \mu W cm^{-2}$  (Abb. 2).

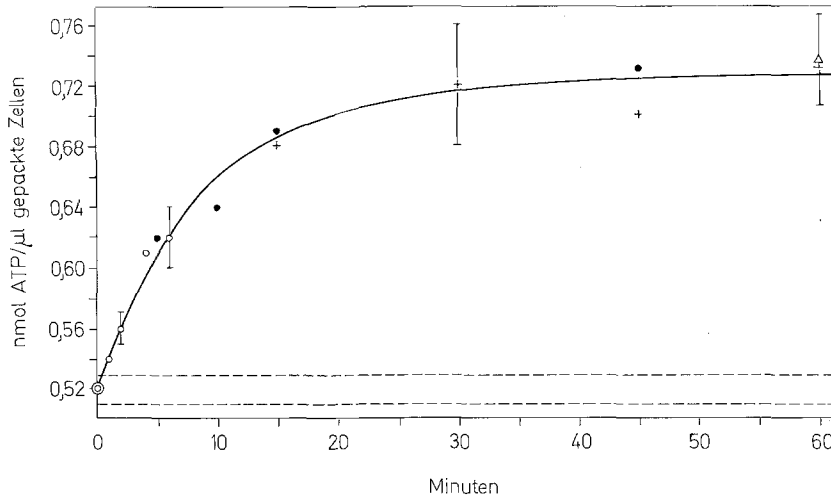
Der dieser Energie entsprechende Quantenbetrag wurde anschließend zur Ermittlung der relativen Quantenwirksamkeit benutzt, für die wir 13 enge Spektralbereiche von 369 bis 724 nm auswählten. Nach 15, 30, 45 und 60 min wurden der ATP-Gehalt der Zellen im jeweiligen Licht und der einer stets parallel laufenden Dunkelkontrolle bestimmt. Abbildung 3 zeigt – stellvertretend für die nach allen benutzten Zeiten grundsätzlich gleichen Resultate – anhand der 60minütigen Bestrahlung, daß nur Blaulicht zu einer Erhöhung des ATP-Spiegels führt. Wellenlängen um 455 nm weisen dabei die größte Wirksamkeit auf; die Wirkung nimmt zum länger- und kürzerwelligen Bereich gleichermaßen rasch ab. Ob die Strahlung des nahen UV wieder verstärkt zur ATP-Bildung führt, ist aus technischen Gründen nicht zu entscheiden.

## Diskussion

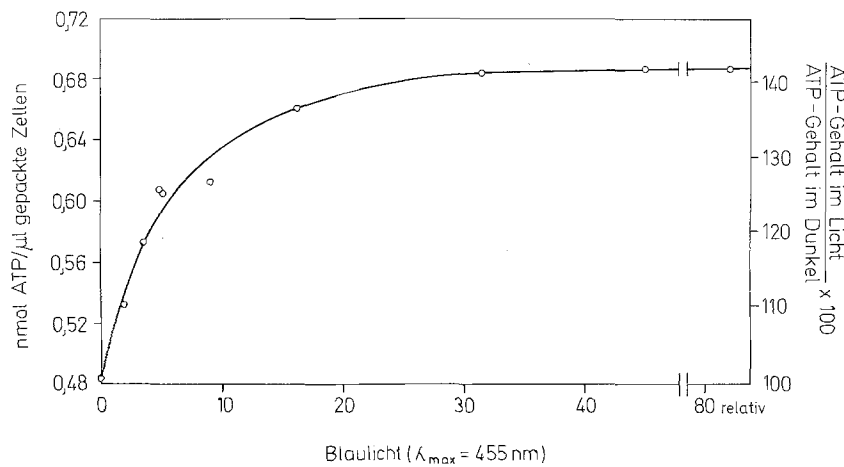
Anlaufzeit, Intensitäts- und Wellenlängenabhängigkeit der lichtbedingten Veränderung im ATP-Spiegel des untersuchten chlorophyllfreien Stammes von *Chlorella* deuten einheitlich darauf hin, daß diese Verschiebung im Zusammenhang mit dem lange bekannten vermehrten Substratabbau im Licht steht (Kowallik, 1967; Georgi, 1974). Die Art der Beziehung ist aus den vorhandenen Daten nicht klar ableitbar, so

**Tabelle 1.** ATP-, ADP- und AMP-Gehalt (nmol/ $\mu$ l gZ) von *Chlorella vulgaris*, chlorophyllfreie Mutante Nr. 20 im Dunkel und im Blau ( $n=8$ )

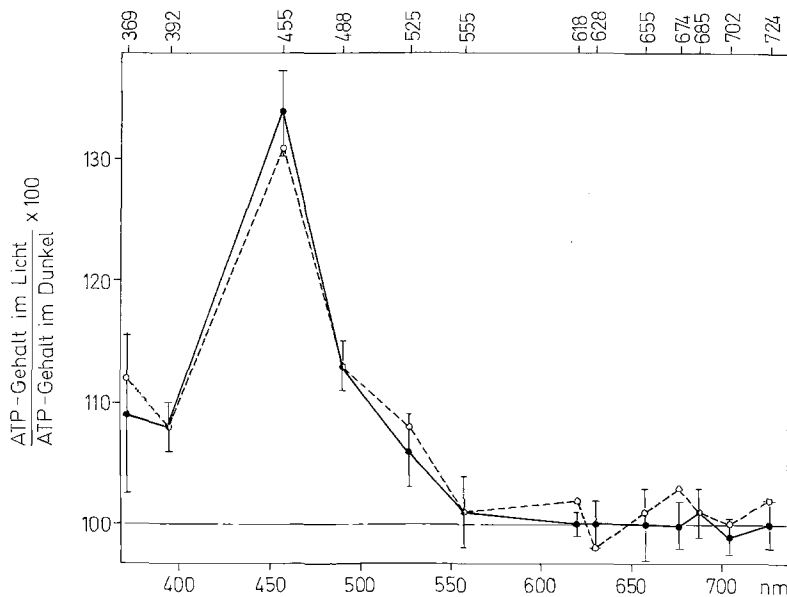
	Dunkel	Blau	Veränderung
AMP	0,20	0,13	-0,07
ADP	1,02	0,84	-0,18
ATP	0,45	0,70	+0,25
Summe	1,67	1,67	$\pm 0$



**Abb. 1.** Zunahme des ATP-Gehalts bei Zellen der chlorophyllfreien *Chlorella*-Mutante 211-11 h/20 in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit mit Blaulicht ( $\lambda < 550 \text{ nm}$ ;  $\sim 300 \mu\text{W cm}^{-2}$ ). 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,5;  $30 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Verschiedene Symbole = zusammengehörende Meßreihen; n/Meßpunkt = durchschnittlich 4. Senkrechte Balken = mittlere Abweichung vom Mittelwert



**Abb. 2.** ATP-Zunahme bei Zellen der chlorophyllfreien *Chlorella*-Mutante 211-11 h/20 nach 30minütiger Bestrahlung mit Blaulicht ( $\lambda_{\text{max}} 455 \text{ nm}$ , HB 13 nm) verschiedener Intensität;  $30 \pm 0,1^\circ\text{C}$ .  $n$  = durchschnittlich 6



**Abb. 3.** ATP-Zunahme bei Zellen der chlorophyllfreien *Chlorella*-Mutante 211-11 h/20 nach 60minütiger Bestrahlung mit quantenstromgleichem Licht verschiedener Wellenlängen ( $\lambda 455 \text{ nm} = \sim 5 \mu\text{W cm}^{-2}$ ). 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,5;  $30 \pm 0,1^\circ\text{C}$ .  $n$  bei  $\lambda < 525 \text{ nm}$  = durchschnittlich 22, bei  $\lambda > 525 \text{ nm}$  = durchschnittlich 11. ATP-Gehalt der belichteten Probe in Prozent desjenigen der jeweils parallelen Dunkelprobe; senkrechte Balken = mittlere Abweichung vom Mittelwert

daß zur Zeit nur diesbezügliche Möglichkeiten diskutiert werden können. Dazu erscheint die Annahme vertretbar, daß die beobachteten Veränderungen (auch) die Verhältnisse im Cytoplasma widerspiegeln: Denn wenn auch keine direkten Daten für die intrazelluläre Verteilung des Nucleotids vorliegen, so machen der Befund einer fördernden Blaulichtwirkung auf die Gärung einerseits (Kowallik, 1969) und die heutigen Vorstellungen über die Photophosphorylierung andererseits die Möglichkeit einer spezifischen Festlegung von ATP im Mitochondrion oder in der Plastide, den in diesem Zusammenhang sicher wichtigsten Zellkompartimenten, nicht wahrscheinlich.

Trifft diese Annahme zu, so ist zunächst die naheliegende, schon in der Einleitung geäußerte Vermutung, der im Licht gesteigerte Substratabbau resultiere aus einer durch Herabsetzen des cytoplasmatischen ATP-Spiegels bedingten Verminderung der allosterischen Hemmung glykolytischer Enzyme, nicht weiter aufrecht zu erhalten.

Bleibt man beim Konzept einer entscheidenden Regulation des Substratdurchsatzes mittels der Adenylate, so könnte einmal der Verlust der Regulierbarkeit, zum andern eine Neubildung ATP-regulierter Enzyme im Licht zum gleichzeitigen Anstieg von Substratdurchsatz und ATP-Gehalt führen. Ein die ATP-Regulation unterbindender Lichteffect ist für isolierte Phosphofruktokinase aus Schafherz beschrieben (Ahlfors und Mansour, 1969), eine Neusynthese im Blau für die Pyruvatkinase der hier bearbeiteten chlorophyllfreien Alge wahrscheinlich gemacht worden (Kowallik und Ruyters, 1976). Ob ersteres in intakten pflanzlichen Zellen auftritt, ist unbekannt; und zum sicheren Nachweis der PK-Neusynthese bedarf es einer Bestrahlungszeit von mehreren Stunden, während die Zunahme von ATP und Atmungsgaswechsel schon nach 5 min faßbar, nach 30 min bereits gesättigt sind.

Zieht man deshalb auch andere Regulationsmöglichkeiten in Betracht, so führt der beobachtete vermehrte Anfall von Hexosen und Hexosephosphaten Monojodacetat-vergifteter Chlorellen im Blau (Kowallik und Ruyters, 1976) zur Annahme einer lichtbedingten Beschleunigung des im Dunkel begrenzend wirkenden Substratzustroms aus dem Speicherkompartiment. In Verfolgung dieses Gedankens überprüfen wir zur Zeit sowohl die Möglichkeit einer Beeinflussung der Plastidenmembran, als auch die einer Aktivierung der Stärke-abbauenden Enzyme Amylase und Phosphorylase durch Licht.

An einigen Grundversuchen war Frl. Dipl.-Biol. Renate Kirst beteiligt. Wir danken Frl. Iris Pischel für technische Assistenz, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung.

## Literatur

- Ahlfors, C.E., Mansour, T.E.: Studies on heart phosphofruktokinase. Desensitization of the enzyme to adenosine triphosphate inhibition. *J. biol. Chem.* **244**, 1247–1251 (1969)
- Atkinson, D.E., Walton, G.M.: Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. *J. biol. Chem.* **242**, 3239–3241 (1967)
- Codd, G.A., Schmid, G.H., Kowallik, W.: Further enzymic studies and electron microscopy of the microbodies of a mutant of *Chlorella vulgaris*. *Arch. Mikrobiol.* **92**, 21–38 (1973)
- Georgi, M.: Über blaulichtbedingte Veränderungen im Kohlenhydrat- und Proteingehalt einer chlorophyllfreien Mutante von *Chlorella vulgaris*. Dissertation, Köln 1974
- Jaworek, D., Grube, W., Bergmeyer, H.U.: Adenosin-5'-triphosphat und Adenosin-5'-diphosphat und Adenosin-5'-monophosphat. In: Methoden der enzymatischen Analyse Bd. II, S. 2146–2151 und 2178–2181, Hrsg.: Bergmeyer, H.U. Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie 1974
- Kowallik, W.: Über die Wirkung des blauen und roten Spektralbereichs auf die Zusammensetzung und Zellteilung synchronisierter Chlorellen. *Planta (Berl.)* **58**, 337–365 (1962)
- Kowallik, W.: Action spectrum for an enhancement of endogenous respiration by light in *Chlorella*. *Plant Physiol.* **42**, 672–676 (1967)
- Kowallik, W.: Eine fördernde Wirkung von Blaulicht auf die Säureproduktion anaerob gehaltener Chlorellen. *Planta (Berl.)* **87**, 372–384 (1969)
- Kowallik, W.: Light stimulated respiratory gas exchange in algae and its relation to photorespiration. In: Photosynthesis and photorespiration p. 514–522, Eds.: Hatch, M.D., Osmond, C.B., Slatyer, R.O. New York: Wiley Interscience 1971
- Kowallik, W., Gaffron, H.: Respiration induced by blue light. *Planta (Berl.)* **69**, 92–95 (1966)
- Kowallik, W., Schmid, G.H.: Zur Glykolatoyxidation einzelliger Grünalgen. *Planta (Berl.)* **96**, 224–237 (1971)
- Kowallik, W., Kirst, R.: Über unterschiedliche Temperaturabhängigkeiten des Atmungsgaswechsels einer chlorophyllfreien *Chlorella*-Mutante im Dunkel und im Licht. *Planta (Berl.)* **124**, 261–266 (1975)
- Kowallik, W., Ruyters, G.: Über Aktivitätssteigerungen der Pyruvatkinase durch Blaulicht oder Glucose bei einer chlorophyllfreien *Chlorella*-Mutante. *Planta (Berl.)* **128**, 11–14 (1976)
- Laudenbach, B., Pirson, A.: Über den Kohlenhydratumsatz in *Chlorella* unter dem Einfluß von blauem und rotem Licht. *Arch. Mikrobiol.* **67**, 226–242 (1969)
- Pätau, K.: Zur statistischen Beurteilung von Meßreihen. (Eine neue t-Tafel). *Biol. Zbl.* **63**, 152–168 (1943)
- Steup, M., Pirson, A.: Über den Einfluß des blauen und roten Spektralbereichs auf Phosphatfraktionen, besonders Polyphosphate, bei Grünalgen. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **166**, 447–459 (1974)
- Syrett, P.J.: Respiration rate and internal adenosine triphosphate concentration in *Chlorella*. *Arch. Biochem. Biophys.* **75**, 117–124 (1958)
- Tomova, N., Dimitrieva, L., Setchenska, M., Dimova, O., Detchev, G.: Spectrophotometric determination of the intermediates of glycolysis and the pentose phosphate cycle in *Chlorella* cells. *Arch. Mikrobiol.* **76**, 204–211 (1971)
- Turner, J.F., Turner, D.H.: The regulation of carbohydrate metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **26**, 159–186 (1975)
- Urbach, W., Kaiser, W.: Changes of ATP-levels in green algae and intact chloroplasts by different photosynthetic reactions. In: Proc. 2nd Intern. Congr. Photosynth. Res. Stresa 1971, p. 1401–1411, Eds.: Forti, G., Avron, M., Melandri, A. The Hague: Dr. W. Junk N. V. Publ. 1972

Eingegangen am 12. Januar; angenommen am 26. März 1976