

## Über Aktivitätssteigerungen der Pyruvatkinase durch Blaulicht oder Glucose bei einer chlorophyllfreien *Chlorella*-Mutante

Wolfgang Kowallik und Günter Ruyters

Botanisches Institut der Universität, Gyrhofstr. 15, D-5000 Köln-41, Federal Republic of Germany

### Enhancement of Pyruvate Kinase Activity by Blue Light or Glucose in a Chlorophyll-free *Chlorella*-mutant

**Summary.** Crude extracts of dark-kept resting cells of a chlorophyll-free, carotenoid-containing mutant of *Chlorella vulgaris* Beijerinck (211–11h/20) were found to convert  $14.44 \pm 0.77$  nmol PEP per min and mg protein into pyruvate by the action of pyruvate kinase (=PK; EC 2.7.1.40). When such cells were exposed to blue light ( $\lambda < 550$  nm,  $\sim 300 \mu\text{W cm}^{-2}$ ) for 3 hrs the PK-activity/protein of their crude extracts rose to  $21.47 \pm 1.30$ , i.e., it was enhanced by 43%. Poisoning with  $10^{-3}$  mol cycloheximide or with 150  $\mu\text{g}$  actinomycin D/ml prevented the effect of blue light by 80–90% (Table 1). This result points to an induction of enzyme synthesis in blue light. Addition of 1% glucose in the dark resulted in an increase in PK-activity, too. Three hrs after application of glucose the PK-activity was  $28.05 \pm 1.88$  nmol/min and mg protein, which was 94% greater than in the control. The effect of glucose was also largely preventable by cycloheximide ( $10^{-3}$  mol) or by actinomycin D (150  $\mu\text{g/ml}$ ) (Table 2). These results lead to the conclusion that blue light may induce the synthesis of PK by supplying free sugars at the site of enzyme synthesis. The assumption is supported by the observation that in hot water extracts of blue illuminated cells in which glucose oxidation had been poisoned by  $10^{-2}$  mol monoiodoacetic acid there was 60% more glucose, glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate and sucrose detectable than in extracts of equally poisoned algae from darkness (Table 3). It is suggested that blue light activates a system for the transport of sugar out of the chloroplast, which results in the induction of respiratory enzyme synthesis and thus in enhanced respiration.

### Einleitung

Der allmähliche Abbau der zelleigenen Kohlenhydratreserven einer chlorophyllfreien – und damit hetero-

trophen – gelben *Chlorella*-Mutante im Dunkel ist durch Bestrahlung mit Blaulicht auf ein Mehrfaches zu steigern (Kowallik und Gaffron, 1966; Georgi, 1974). Bei der Suche nach Ansatzpunkt und Mechanismus dieser Lichtwirkung prüften wir auch die Beeinflussbarkeit respiratorischer Enzyme durch sichtbare Strahlung. Über die dabei beobachtete deutliche Aktivitätssteigerung der Pyruvatkinase durch Blaubelichtung wird im folgenden berichtet.

### Material und Methodik

Versuchsobjekt war die chlorophyllfreie, carotinoidhaltige Mutante Nr. 20 von *Chlorella vulgaris* Beijerinck (211–11h/20 der Algen-sammlung des Pflanzenphysiologischen Instituts Göttingen), die in der kürzlich mitgeteilten Weise vermehrt wurde (Kowallik und Kirst, 1975).

Für die Enzymversuche wurden ruhende Zellen aus 10–14 d alten Kulturen (vgl. Georgi, 1974) auf der Zentrifuge vom Nährmedium befreit, dreimal mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und zu einer Dichte von 80–160  $\mu\text{l}$  gepackte Zellen (10minütige Zentrifugation bei 2200 g) pro ml Suspension in 0,1 mol  $\text{NaHCO}_3$  pH 7,5 suspendiert. 10 ml-Proben dieser Suspension wurden in Erlenmeyer pipettiert, die in Warburg-Wasserbäder von  $30 \pm 0,1^\circ\text{C}$  eingehängt und mit 90 Ausschlägen/min im Dunkeln geschüttelt wurden. Bestrahlung mit Blaulicht ( $\lambda < 550$  nm, rund  $300 \mu\text{W cm}^{-2}$ ), das 4 Quecksilber-Hochdrucklampen (Philips HPL, 250 W) und ein 2 mm dickes blaues Plexiglas (Roehm und Haas, Darmstadt) lieferten, erfolgte vom Boden. Zur gewünschten Zeit wurden den Kolben 3,6 ml entnommen, die nach 2maligem Waschen mit  $\text{NaHCO}_3$  mit dem gleichen Volumen von Glasperlen ( $\varnothing 0,5\text{mm}$ ) vermischt für 5 min bei  $0-5^\circ\text{C}$  in einer Vibrogen-Zellmühle (Fa. Bühler, Tübingen) geschüttelt wurden. Die anschließende mikroskopische Kontrolle ergab mehr als 95% aufgebrochene Zellen. Das erhaltene Homogenat wurde für 30 min bei 20000 g zentrifugiert (Sorvall RC 2-B) und der resultierende Überstand (= Rohextrakt) zur Bestimmung von Pyruvatkinase-Aktivität (Boehringer-Test-Kombination Nr. 15985) und löslichem Protein (Lowry, 1951) benutzt. Der angewandte PK-Test beruht auf der NADH-abhängigen Reduktion von Pyruvat, das in Gegenwart von PK aus zugesetztem PEP gebildet wird. Der Ansatz enthält: 2,0 ml 0,16 mol Triäthanolaminpuffer pH 7,5 + 0,12 mol KCl + 21 mmol  $\text{MgSO}_4$  + 1,3 mmol EDTA; 0,1 ml 6 mmol NADH + 32,5 mmol PEP; 0,05 ml LDH (0,5 mg/ml); 0,2 ml Rohextrakt; 0,8 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest; 0,1 ml 0,1 mol ADP. Die Messung erfolgte bei  $25^\circ\text{C}$ . Zu Beginn des Tests wurde in Abwesenheit von ADP über 10 min die Aktivität der PEP-Phospha-

Abkürzungen: PK = Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40), PEP = Phosphoenolpyruvat, LDH = Lactatdehydrogenase.

tase erfaßt, die zur quantitativen Ermittlung der PK-Aktivität, die nach ADP-Zusatz gleichzeitig vorliegt, benötigt wird.

Bei Vergiftung mit Monojodessigsäure (Merck 374) wurden die Zellen in 0,1 mol Phosphatpuffer suspendiert, der wegen der im alkalischen Milieu geringen Aufnahme des Hemmstoffs auf pH 5,0 eingestellt wurde.

Zur Bestimmung der zelleigenen freien Zucker wurden etwa 2,5 ml gepackte Zellen aus solchen Suspensionen dreimal 5 min mit insgesamt 24 ml H<sub>2</sub>O bei 80° C extrahiert, die nach 3minütiger Zentrifugation erhaltenen vereinigten Überstände bei 30° C am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und der Rückstand schließlich in 1 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen. Von diesem Extrakt wurden 12,5 µl an Zellulose-Dünnschichten (Cellulosepulver MN300, Macherey, Nagel & Co, Düren) für 3,5 h mit einem Laufmittel nach Feige *et al.* (1969) bei Zimmertemperatur chromatographiert. Die Platten wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet, danach mit Anilinphtalat (Merck 1266) besprüht und anschließend bei 120° C im Trockenschrank entwickelt (30 min). Im selben Extrakt wurden freie Glucose und Glucose-6-Phosphat mittels der Hexokinase-Testkombination von Boehringer (15931), Fructose-6-Phosphat mit demselben Test nach Applikation von 35 U Phosphoglucose-Isomerase (Boehringer 15433) zum Ansatz und Saccharose ebenfalls mit Hilfe dieses Tests nach vorheriger 5minütiger Einwirkung von Invertase (Serva 26370) bestimmt.

Cycloheximid (Actidion), Serva 10700;  
Actinomycin C<sub>1</sub>=D, Boehringer 15531.

## Ergebnisse

In einem Rohextrakt aus ruhenden, im Dunkel gehaltenen Zellen der chlorophyllfreien, carotinoidhaltigen Mutante Nr. 20 von *Chlorella vulgaris* werden infolge von PK-Aktivität im Mittel von 10 Versuchen in einer

Minute pro mg Protein  $14,44 \pm 0,77$  nmol PEP zu Pyruvat umgesetzt. Nach 1stündiger Blaubelichtung ( $\lambda < 550$  nm, etwa  $300 \mu\text{W cm}^{-2}$ ) derartiger Zellen ist im daraus gewonnenen Rohextrakt ein Umsatz von  $18,22 \pm 1,81$ , nach 3stündiger Bestrahlung ein solcher von  $21,47 \pm 1,30$  nmol/min und mg Protein meßbar. Da ein um 3 h verlängerter Aufenthalt der Zellen im Dunkel zu keiner signifikanten Änderung der PK-Aktivität führt ( $15,02 \pm 0,56$  nmol/min und mg Protein), ergibt sich nach 1stündiger Blaubestrahlung eine um rund 26%, nach 3stündiger eine um rund 43% größere spezifische Pyruvatkinase-Aktivität als im Dunkel. Dieser Anstieg könnte durch einen Abfall im Gesamtprotein der Proben zustandekommen, doch widerlegen die PEP-Umsätze und Proteingehalte pro ml der jeweiligen Rohextrakte diese Möglichkeit weitgehend: Bei nur geringen Schwankungen letzterer (vgl. auch Tabelle 1 und 2) betragen erstere in den Proben eines repräsentativen Einzelversuchs im Dunkel 33,8 und im Licht 39,8 bzw. 46,6 nmol/min.

Der lichtbedingte Aktivitätsanstieg scheint nicht auf einer Enzymaktivierung, vielmehr auf einer Neusynthese zu beruhen. Dafür spricht in erster Linie die Wirkung zweier Proteinsynthese-Hemmstoffe (Tabelle 1).

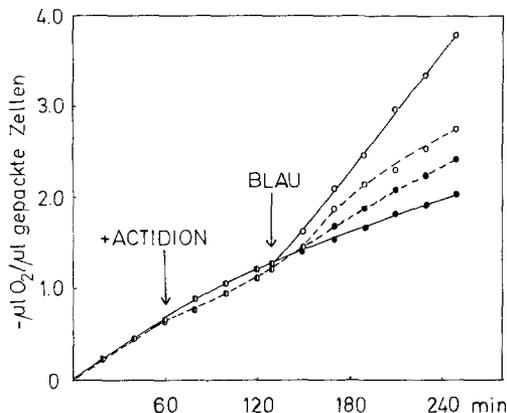
In Gegenwart von  $10^{-3}$  mol Cycloheximid, bei der die PK-Aktivität im Rohextrakt dunkelgehaltener Zellen um etwa 30% geringer ist als in dem der unvergifteten Kontrolle, liegt nach 3stündiger Blaubestrahlung

**Tabelle 1.** PK-Aktivität/ml (nmol/min), Protein/ml (mg) und PK-Aktivität/Protein (nmol/min und mg) in Rohextrakten der gelben *Chlorella*-Mutante 211–11 h/20 nach Aufenthalt im Dunkel oder Blaulicht ( $\lambda < 550$  nm,  $\sim 300 \mu\text{W cm}^{-2}$ ) bei Abwesenheit und Gegenwart von  $10^{-3}$  mol Cycloheximid (Zusatz 1 h vor Lichtbeginn, damit Gesamtzeit = 1 h dunkel + 3 h dunkel oder blau) bzw. 140 µg Actinomycin D/ml (Zusatz 3 h vor Lichtbeginn, damit Gesamtzeit = 3 h dunkel + 3 h dunkel oder blau). Inkubation bei  $30 \pm 0,1^\circ\text{C}$ , Aufarbeitung s. Methodik

Hemmstoff	Cycloheximid				Actinomycin D			
	–		+		–		+	
	dunkel	blau	dunkel	blau	dunkel	blau	dunkel	blau
Aktivität/ml	37,2	57,1	25,6	28,3	45,2	65,0	38,2	36,8
Protein/ml	2,4	2,3	2,3	2,3	2,9	2,7	2,8	2,5
Aktivität/Protein	15,5	24,8	11,1	12,3	15,6	24,1	13,6	14,7

**Tabelle 2.** PK-Aktivität/ml (nmol/min), Protein/ml (mg) und PK-Aktivität/Protein (nmol/min und mg) in Rohextrakten der in glucosefreiem oder 1% glucosehaltigem Bicarbonatpuffer gehaltenen gelben *Chlorella*-Mutante 211–11 h/20 bei Abwesenheit und Gegenwart von  $10^{-3}$  mol Cycloheximid (Zusatz 1 h vor Glucosegabe, damit Gesamtzeit = 1 h ohne + 3 h ohne oder mit Glucose) bzw. 150 µg Actinomycin D/ml (Zusatz 3 h vor Glucosegabe, damit Gesamtzeit = 3 h ohne + 3 h ohne oder mit Glucose). Inkubation bei  $30 \pm 0,1^\circ\text{C}$  im Dunkel. Aufarbeitung s. Methodik

Hemmstoff	Cycloheximid				Actinomycin D			
	–		+		–		+	
	–	+	–	+	–	+	–	+
1% Glucose								
Aktivität/ml	32,8	60,4	22,7	30,0	31,9	58,5	25,2	34,9
Protein/ml	2,3	2,5	2,1	1,9	2,3	2,4	2,3	2,3
Aktivität/Protein	14,3	24,2	10,8	15,8	13,9	24,4	11,0	15,2



**Abb. 1.** O<sub>2</sub>-Verbrauch der chlorophyllfreien Mutante Nr. 20 von *Chlorella vulgaris* (211-11h/20) in Abwesenheit (—) und Gegenwart von  $3,5 \times 10^{-4}$  mol Cycloheximid (= Actidion) (---) im Dunkel (●) und im Blau (○). 0,1 mol Phosphatpuffer pH 6,5,  $30 \pm 0,1^\circ \text{C}$

lediglich eine Aktivitätssteigerung von 7,7% vor, während gleich lange Bestrahlung in der giftfreien Kontrolle zu einer Erhöhung von 57,3% führt. Nach Zusatz von Actinomycin D (150 µg/ml Zellsuspension) ist bei einer Aktivitätsminderung von rund 14% im Dunkel im Blau nur eine Aktivitätszunahme von 9,6% meßbar, der in der unvergifteten Kontrolle eine Steigerung um 56,2% gegenüber steht.

Zu diesem Resultat paßt die Beobachtung, daß bei Cycloheximid-Vergiftung der Zellen mit der die Dunkelatmung noch nicht erkennbar beeinträchtigenden Konzentration von  $3,5 \times 10^{-4}$  mol Blaubeleuchtung nur zu einer geringen Steigerung des O<sub>2</sub>-Verbrauchs führt (Abb. 1).

Als weitere Stütze für eine PK-Neusynthese im Blau kann auch der Befund gewertet werden, daß bei Versorgung ruhender Zellen mit frischem – jedoch glucosefreiem – Nährmedium eine Steigerung der PK-Aktivität noch ausgeprägter auftritt. Sie beträgt im Mittel von 4 Versuchen nach 1 h Blaubeleuchtung  $37,0 \pm 4,9\%$  nach 3 h Blau  $62,5 \pm 6,2\%$ .

Gegen eine blaublichtbedingte Enzymaktivierung spricht schließlich auch das Fehlen signifikanter Aktivitätsänderungen nach bis zu 2stündiger Blaubeleuchtung von Rohextrakten aus im Dunkel gehaltenen Zellen gegenüber gleich lange im Dunkel aufbewahrten Extraktproben.

Versetzt man wie oben in Bicarbonat suspendierte ruhende Zellen im Dunkel mit 1% exogener Glucose, so steigt die proteinbezogene PK-Aktivität in deren Rohextrakten ebenfalls deutlich an. Im Mittel von 4 Versuchen wurden vor Glucosezusatz  $14,48 \pm 0,51$ , nach 1stündiger Glucoseeinwirkung  $20,78 \pm 0,49$  und nach 3stündiger  $28,05 \pm 1,88$  nmol PEP/min und mg Protein umgesetzt. Das sind Aktivitätssteigerungen von 44 bzw. 94%. Auch sie sind durch vorherigen

**Tabelle 3.** Gehalt an Hexose (phosphaten) und Saccharose (µg/ml) in Heißwasser-Extrakten (s. Methodik) aus Monojodessigsäurevergifteten ( $10^{-2}$  mol) Zellen der gelben *Chlorella*-Mutante 21-11h/20 nach 16stündigem Aufenthalt im Dunkel oder im Blau ( $\lambda < 550 \text{ nm}$ ,  $\sim 300 \mu\text{W cm}^{-2}$ );  $30 \pm 0,1^\circ \text{C}$

	Glucose Glucose-6- Phosphat	Fructose-6- Phosphat	Saccharose	Summe
dunkel	329,8	137,1	1213,1	1680,0
blau	441,5	196,6	2049,9	2688,0
Zunahme in blau	33,9%	43,4%	69,0%	60,0%

Zusatz von  $10^{-3}$  mol Cycloheximid oder 150 µg Actinomycin D/ml grobenteils zu unterbinden, dürften danach maßgeblich auf einer Glucose-induzierten Enzymprotein-Neusynthese und nicht nur auf einer stabilisierenden, die Lebensdauer des Enzyms verlängernden Wirkung der Glucose beruhen (Tabelle 2).

Die vergleichbare Wirkung von Blaublicht und Glucose auf die PK-Aktivität eröffnet die Möglichkeit, daß die in beiden Fällen wahrscheinlich gemachte Neusynthese des Enzyms auch im Blau durch einen verstärkten Anfall freier Glucose bzw. ihrer Folgeprodukte induziert wird. Wenn dies zutrifft, sollte bei Unterbinden des Hexoseabbaus im Blau ein höherer Spiegel von Zuckern vorliegen als im Dunkel. Wir haben dazu die Zellen mit  $10^{-2}$  mol Monojodessigsäure vergiftet, die – maßgeblich durch Blockierung der Triosephosphat-Dehydrogenase – in dieser Konzentration beim pH 5,0 des Suspensionsmediums (=0,1 mol Phosphatpuffer, s. Methodik) gerade zur kompletten Unterdrückung der O<sub>2</sub>-Aufnahme im Dunkel und im Blau führt (Schwarzmann, 1973). Rohextrakte von 16 h derart behandelten Zellen aus Dunkel oder Blaublicht wiesen keine meßbare PK-Aktivität auf; die der unvergifteten Kontrollen aus Dunkel dephosphorylierten in einem Repräsentativversuch in 1 min pro mg Protein 14,07, die aus Blau 29,12 nmol PEP zu Pyruvat, hatten damit Umsätze, die denen für Extrakte aus Zellen der bisher untersuchten Bicarbonatsuspensionen vom pH 7,5 entsprachen. Im Heißwasser-Extrakt der vergifteten Zellen waren mittels Dünnschichtchromatographie Saccharose, Glucose und Fructose-6-Phosphat – in einigen Fällen auch wenig Glucose-6-Phosphat – nachweisbar. Alle Komponenten lagen im Extrakt aus blaublichteten Zellen in höheren Konzentrationen vor als in dem der dunkel gehaltenen Proben (Tabelle 3).

## Diskussion

Die beschriebene, offenbar über eine Enzym-Neusynthese erfolgende Regulation der PK-Aktivität durch

den Kohlenhydratgehalt der Zelle ist für tierische Gewebe gut bekannt (Weber *et al.*, 1966; Seubert und Schoner, 1971) und auch für Hefe (Hommes, 1966) und *Euglena* (Ohmann, 1969) bereits nachgewiesen worden. Ob dabei Glucose selbst oder eines ihrer Abbauprodukte die PK-Synthese induziert, ist in der Regel nicht geprüft worden; in unserem Fall deutet das Fehlen jeglicher Aktivität nach 16stündiger Monojodacetat-Vergiftung deutlich auf ein späteres Produkt als Induktor. Diese Wirkung von Monojodacetat gibt neben denen von Cycloheximid und Actinomycin auch erste Auskünfte über die Lebensdauer des Enzyms sowie über seine Stabilisierbarkeit durch das Substrat. Diese Fragen sollen von uns gesondert verfolgt werden.

Die mit der nach Angebot exogener Glucose vergleichbare Wirkung von Blaulicht auf die PK-Aktivität sowie das Vorliegen von mehr Hexosen, Hexosephosphaten und Saccharose im Extrakt belichteter gegenüber dem dunkelgehaltener Zellen ermöglicht die Annahme, daß die lange bekannte Atmungssteigerung im Blau über einen lichtbedingten Glucoseanfall im Plasma und eine damit verbundene Neusynthese respiratorischer Enzyme zustande kommt. Als Quelle solcher Glucose kämen in den untersuchten ruhenden Zellen wohl nur die im Plastidenrudiment lokalisierten polymeren Kohlenhydratreserven infrage (Kowallik, 1966). Sowohl ihre Degradation als auch der Austransport ihrer Bruchstücke könnte durch Blaulicht intensiviert werden. Eine lichtbedingte Aktivierung des Glucose-abbauenden Enzyms von *Euglena* ist von Dwyer und Smillie (1970) beschrieben worden und entsprechendes damit grundsätzlich auch für unser Objekt in Erwägung zu ziehen. Gegenwärtig liegen uns jedoch Daten vor, die mit der Vorstellung der Aktivierung eines aktiven Kohlenhydrataustrags aus dem Speicherkompartiment durchaus in Einklang zu bringen sind. So haben wir für eine aktive Glucoseaufnahme aus dem Medium eine Temperaturabhängigkeit bestimmt, die mit ihrem Optimum bei etwa 36° C derjenigen des O<sub>2</sub>-Verbrauchs in Gegenwart exogener Glucose weitgehend gleicht. Beide Optima sind deutlich verschieden von dem bei rund 47° C liegenden der endogenen Dunkelatmung, ähneln jedoch stark dem bei etwa 32° C beobachteten Optimum des O<sub>2</sub>-Verbrauchs – und damit Kohlenhydratabbau – im Blaulicht (Kowallik und Kirst, 1975). Es ist danach vorstellbar, daß letztere Temperaturabhängigkeit durch den Temperatureinfluß auf ein lichtaktiviertes, die Plastidenhüllmembran durchquerendes Glucose-transportsystem bedingt ist. Die Beobachtung von Jeffrey *et al.* (1974), wonach die Hülle der Spinatplastide besonders reich an Carotinoiden ist, macht die Annahme einer spezifischen Lichtwirkung in dieser Membran zusätzlich attraktiv.

Diese unsere momentane Arbeitshypothese, die durch die Möglichkeit eines mit dem Glucoseausstrom gekoppelten Protonen-Transports, wie er von Komor (1973) für die Außenmembran der Wildtyp-Zelle beschrieben wird, dahingehend erweitert werden könnte, daß der blaulichtgesteuerte Glucoseausstrom aus dem Chloroplasten zur Bildung von ATP führt, ermöglicht einen Zugang zum Verständnis einiger bisher unvollkommen verstandener Wirkungen von Blaulicht oder auch Spuren kurzwelligen Zusatzlichts zu Rot im Rahmen der Photosynthese. Wir werden diese Vorstellungen prüfen.

Wir danken Fr. Iris Pischel für technische Assistenz und Herrn Franz-Rainer Klein für Hilfe bei der Chromatographie. W.K. ist der Deutschen Forschungsgemeinschaft zu Dank verpflichtet, die diese Arbeiten finanziell unterstützt.

## Literatur

- Dwyer, M.R., Smillie, R.M.: A light-induced  $\beta$ -1,3-glucan breakdown associated with the differentiation of chloroplasts in *Euglena gracilis*. *Biochim. biophys. Acta* (Amst.) **216**, 392–401 (1970)
- Feige, B., Gimmler, H., Jeschke, W.D., Simonis, W.: Eine Methode zur dünnstichtchromatographischen Auftrennung von <sup>14</sup>C- und <sup>32</sup>P-markierten Stoffwechselprodukten. *J. Chromat.* (Amst.) **41**, 80–90 (1969)
- Georgi, M.: Über blaulichtbedingte Veränderungen im Kohlenhydrat- und Proteingehalt einer chlorophyllfreien Mutante von *Chlorella vulgaris*. Dissertation, Köln 1974
- Hommes, F.A.: Effect of glucose on the level of glycolytic enzymes in yeast. *Arch. Biochem.* **114**, 231–233 (1966)
- Jeffrey, S.W., Douce, R., Benson, A.A.: Carotenoid transformation in the chloroplast envelope. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **71**, 807–810 (1974)
- Komor, E.: Proton-coupled hexose transport in *Chlorella vulgaris*. *FEBS letters* **38**, 16–18 (1973)
- Kowallik, W.: Chlorophyll-independent photochemistry in algae. In: Energy conversion by the photosynthetic apparatus, p. 467–477. *Brookhaven Symp. Biol.* **19** (1966)
- Kowallik, W., Gaffron, H.: Respiration induced by blue light. *Planta* (Berl.) **69**, 92–95 (1966)
- Kowallik, W., Kirst, R.: Über unterschiedliche Temperaturabhängigkeiten des Atmungs-gaswechsels einer chlorophyllfreien *Chlorella*-Mutante im Dunkel und im Licht. *Planta* (Berl.) **124**, 261–266 (1975)
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.I.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951)
- Ohmann, E.: Die Regulation der Pyruvat-Kinase in *Euglena gracilis*. *Arch. Mikrobiol.* **67**, 273–292 (1969)
- Schwarzmann, A.: Vergleichende Untersuchungen zum lichtgesteuerten Atmungs-gaswechsel und zur Glykolat-Oxidation einer chlorophyllfreien *Chlorella*-Mutante. Diplomarbeit, Köln 1973
- Seubert, W., Schoner, W.: The regulation of pyruvate kinase. In: Current topics in cellular regulation, p. 237–268, Eds.: B.L. Horecker and E.R. Stadtman. New York: Academic Press 1971
- Weber, G., Singhal, R.L., Stamm, N.B., Lea, M.A., Fisher, E.A.: Synchronous behavior pattern of key glycolytic enzymes: glucokinase, phosphofructokinase, and pyruvate kinase. *Advanc. Enzyme Reg.* **4**, 59–81 (1966)

Eingegangen am 27. Juni; angenommen am 12. August 1975