

# Auftrennung der Proteine der Alge *Chlorella*

Von

**I. Sarang** und **B. J. Radola**

Institut für Physikalische Chemie der Universität Wien

Mit 5 Abbildungen

*(Eingegangen am 20. April 1965)*

Die wasserlöslichen Proteine aus der einzelligen Süßwasseralge *Chlorella pyrenoidosa* wurden nach Homogenisierung der Zellen erhalten. Die Proteine wurden dann einerseits durch Chromatographie auf DEAE-Zellulose, gefolgt von Elektrophorese in Polyacrylamid-Gel, und andererseits durch Gel-Filtration in Sephadex G-200 fraktioniert. Man findet, daß die Proteine nach elektrischer Ladung und Molekulargewicht aus vielen Komponenten bestehen. Einige dieser Komponenten lassen sich jedoch durch die Methode der kombinierten Chromatographie und Elektrophorese charakterisieren. Wesentliche Gehalte an Nukleinsäure wurden bei der Chromatographie nur in der letzten — am schwersten eluierbaren — Fraktion gefunden. Dagegen ist die Nukleinsäure bei der Gel-Filtration über mehrere Fraktionen verteilt.

The water soluble proteins of the unicellular freshwater alga *Chlorella pyrenoidosa* were obtained after homogenization of the cells. The proteins were then fractionated either by DEAE chromatography, followed by electrophoresis in polyacrylamide gel, or by gel filtration in Sephadex G-200. The proteins were found to consist of many components differing in electric charge and molecular size. Some of these components may be characterized by combined chromatography and electrophoresis. Appreciable amounts of nucleic acid have been found in chromatography only in the fraction eluted last. In contrast, in gel filtration nucleic acid is distributed over several fractions.

Während es analytische Daten über die Zusammensetzung von Algenproteinen aus Aminosäuren gibt, sind die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Algenproteine selbst bis jetzt kaum untersucht worden. Versuche zur Auftrennung von Algenproteinen durch Papierelektro-

phorese blieben ohne Erfolg<sup>1</sup>, ähnlich wie die Papierelektrophorese auch bei der Auftrennung tierischer Zellproteine nur beschränkt leistungsfähig ist<sup>2</sup>.

Eine wachsende Anzahl von Befunden weist aber darauf hin, daß Makromoleküle auf Ionenaustauschern aus substituierter Zellulose fraktioniert werden können. Insbesondere trifft das auch für Zellproteine pflanzlichen und tierischen Ursprungs zu<sup>3, 4</sup>.

Zur Fraktionierung von Zellproteinen kann auch die Gel-Filtration auf Sephadex herangezogen werden, bei der Moleküle verschiedener Größe auf Grund einer Molekülsiebwirkung aufgetrennt werden. Ein Vorteil von Chromatographie und Gel-Filtration ist, daß die im analytischen Maßstab gewonnenen Ergebnisse die Grundlage für präparative Auftrennungen bilden können.

Wir haben nun versucht, die wasserlöslichen Algenproteine von *Chlorella pyrenoidosa* mittels Chromatographie auf DEAE-Zellulose und Gel-Filtration zu fraktionieren und als heterogenes System zu charakterisieren.

## Experimenteller Teil

### 1. Gewinnung der Algenproteine

Die Grünalgen wurden in einem Nährmedium, das 0,303 g KNO<sub>3</sub>, 0,136 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,493 g MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 0,005 g Eisencitrat, 2,86 · 10<sup>-3</sup> g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1,81 · 10<sup>-3</sup> g MnCl<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O, 2,2 · 10<sup>-4</sup> g ZnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 8 · 10<sup>-5</sup> g CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O, 5 · 10<sup>-5</sup> g Ammoniummolybdat und 10 g Glucose je Liter Wasser enthielt, in 2-l-Rundkolben 7 Tage bei diffusem Licht gezüchtet und dann durch niedertourige Zentrifugierung geerntet. Ungefähr 15 g Zellen wurden in 20 ml 0,1*m*-Phosphatpuffer\* suspendiert und in einem Homogenisator nach *Merckenschläger*<sup>5</sup> 2 Min. mit Glasperlen (Ballotini Nr. 17) bei 0—5° C homogenisiert. Dabei ist nur relativ geringe Denaturierung der Proteine zu befürchten. Das Homogenat wurde dann 10 Min. bei 10 000*g* zentrifugiert, wobei unerschlagene Zellen, Zellwände, Kerne, Chloroplasten, Mitochondrien und Pyrenoide (Stärkekörner) in den Bodensatz gingen. Der Überstand konnte für die Gel-Filtration direkt, für die Chromatographie auf DEAE-

\* Alle Puffer in dieser Arbeit: pH 7,2, wenn nicht ausdrücklich anders angegeben.

<sup>1</sup> L. Fowden, in: R. A. Lewin (Hsg.), *Physiol. and Biochem. of Algae*, Acad. Press, New York 1962.

<sup>2</sup> R. Krauze, E. Broda, G. Kellner und J. S. Frimmel, *Z. Krebsforsch.* **66**, 409 (1965).

<sup>3</sup> S. Mandeles, *J. Chromatogr.* **3**, 256 (1960); D. H. Simmonds, *Nature* [London] **189**, 306 (1961); H. G. Boman und W. Björk, in: H. F. Linskens und M. V. Tracey (Hsg.): *Mod. Meth. Pflanzenanalyse* **6**, 387 (1963).

<sup>4</sup> B. J. Radola, G. Kellner und S. J. Frimmel, *Nature* **205**, 174 (1965).

<sup>5</sup> M. Merckenschläger, K. Schlossmann und W. Kurz, *Biochem. Z.* **329**, 332 (1957).

Zellulose nach entsprechender Einengung im kalten Luftstrom (Pervaporation) verwendet werden.

Für einen Teil der Versuche wurde der Überstand auf einer Ultrazentrifuge (Spinco Modell L) bei 38 000 UpM (Rotor 50) in einer Stunde in „Pellet“ und 105 000g-Überstand aufgetrennt. Das Pellet wurde in 0,01m-Phosphatpuffer aufgenommen und danach gegen diesen Puffer dialysiert. Der klare, leicht grün gefärbte Überstand wurde ebenfalls gegen 0,01m-Phosphatpuffer dialysiert. Der Überstand entspricht hauptsächlich dem Zellsaft, doch können bei der Aufarbeitung auch Stoffe aus anderen subzellulären Komponenten in ihn gelangen.

## 2. Chromatographie

Die DEAE-Zellulose (Diäthylaminoäthylzellulose, Serva Entwicklungslabor, Heidelberg) wurde der Reihe nach mit 0,3m-NaOH, 0,3m-HCl, 0,3m-Phosphatpuffer, 0,3m-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1m-NaCl und zuletzt mit dem „Ausgangspuffer“ (0,01m-Phosphat) gewaschen. Dann wurde sie im Ausgangspuffer suspendiert und durch Dekantieren von feinen Teilchen befreit. Hierauf wurden Säulen 25 × 1,5 cm bis zu einer Höhe von 20 cm ohne Druck gefüllt und mit dem „Ausgangspuffer“ gespült. Meistens wurden 6—8 ml des 10 000g-Überstandes mit einer Extinktion von 180—250 bei 210 m $\mu$  auf der Säule aufgetragen. Die Elution wurde mit einer Reihe von Phosphatpuffern steigender Molarität und konstanten pH-Wertes, zuletzt mit 0,3m-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1m-NaCl durchgeführt. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 120 ml/Stde., das Fraktionsvolumen war 10 ml. Die Absorption wurde bei 210 m $\mu$ <sup>6</sup> und 260 m $\mu$  gegen die entsprechende Pufferlösung gemessen. Während bei 210 m $\mu$  sowohl Proteine als auch Nukleinsäuren stark absorbieren, ist bei 260 m $\mu$  die Absorption der Proteine im Vergleich zu der von Nukleinsäuren relativ gering; daher kann der Beitrag der Nukleinsäuren aus dem „Verhältnis 210/260“ abgeschätzt werden.

## 3. Gel-Filtration

Trockenes Gel Sephadex G-200 (Pharmacia, Uppsala) wurde in 0,15m-NaCl mit Zusatz von 0,02m-Phosphatpuffer suspendiert und nach mindestens 24stdg. Quellen durch Dekantieren von kleinen Teilchen befreit. Die Säulen (55 × 1 cm) wurden ohne Druck 50 cm hoch gefüllt. Zur Filtration wurde 1 ml einer Lösung mit einer Extinktion von 40—50 bei 210 m $\mu$  aufgetragen. Zu hohe Konzentrationen sollten besonders bei der Mikrosomenfraktion vermieden werden, da sonst die Durchflußgeschwindigkeit zu stark absinkt. Eluiert wurde mit 0,15m-NaCl mit Zusatz von 0,02m-Phosphatpuffer. Das Fraktionsvolumen war 3 ml, die Durchflußgeschwindigkeit 9 ml/Stde. Absorptionsmessungen wurden nach entsprechender Verdünnung der Fraktionen bei 210 und 260 m $\mu$  durchgeführt.

## 4. Papier-Elektrophorese

Die Trennungen wurden auf Filterpapier Whatman Nr. 1 und 3 im Michaelis-Puffer (pH 9,0; Ionenstärke 0,1) bei Zimmertemp. mit horizontaler Anordnung der Streifen durchgeführt. Die Trennzeit war bei einem anfänglichen Spannungsgradienten von 3 V/cm 15 Stdn. Nach der Elektrophorese wurden die Streifen bei 110° C 15 Min. getrocknet und anschließend in üblicher Weise mit Amidoschwarz angefärbt.

<sup>6</sup> M. P. Tombs, F. Souter und N. F. MacLagan, *Biochem. J.* **73**, 167 (1959).

## 5. Gel-Elektrophorese

Der gesamte 10 000g-Überstand sowie die bei der Chromatographie erhaltenen Fraktionen wurden mittels Gel-Elektrophorese nach der Methode von *Michl* und *Pastuszyn*<sup>7</sup> aufgetrennt.

Acrylsäureamid wurde in dem Tris—Komplexon—Borsäure-Puffer gelöst, mit dem Beschleuniger Dimethylaminopropionsäurenitril versetzt, die Lösung durch Evakuieren von Luft befreit, und schließlich Ammonpersulfat zugegeben. Die Lösung wurde dann schnell in Röhrcchen ( $0,5 \times 10$  cm) ca. 6 cm hoch eingefüllt und vorsichtig mit Wasser überschichtet. Nach der Polymerisation des Gels wurde das Wasser abgegossen, und die mit Bromphenolblau angefärbten Proteinlösungen ( $20-60 \cdot 10^{-3}$  ml) aufgebracht.

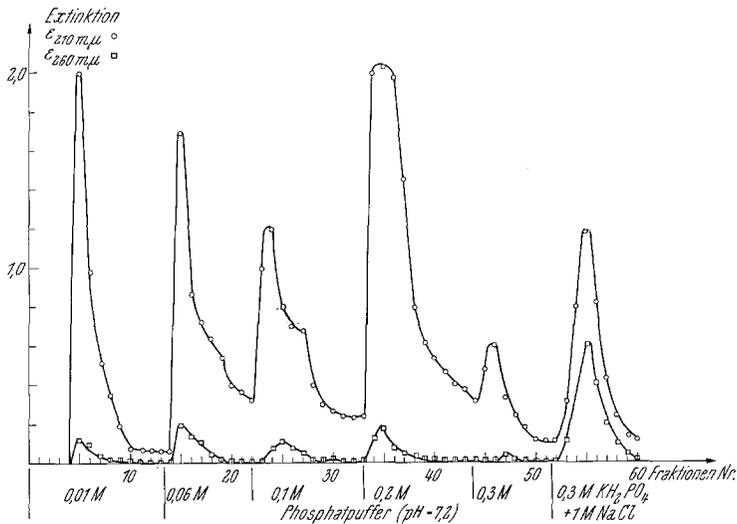


Abb. 1. DEAE-Chromatographie des 10 000g-Überstandes

Diese Proteinlösungen wurden entweder eine Stunde auf dem Gel belassen, wobei ein Teil des Proteins in das Gel eindiffundierte, oder, wenn die Konzentration an Protein kleiner als 2% war, mit Sephadex G-25 vermischt auf das Gel aufgebracht und das Protein durch Elektrophorese in das Gel eingebracht\*; als Endpunkt wurde das Eindringen der Bromphenolblaufärbung in das Gel angesehen. Sodann wurde die überschüssige Flüssigkeit bzw. die Sephadex-Suspension abpipettiert und die Elektrophorese in dem Tris—Komplexon—Borsäure-Puffer bei einer Stromstärke von 2,5—3 mA pro Röhrcchen und einem Spannungsabfall von 10 V/cm ausgeführt. Nach ca. 70—80 Min. wurde die Elektrophorese abgebrochen; die Röhrcchen wurden 10—20 Min. in das Tiefkühlfach eines Eisschranks gebracht. Nach der Abkühlung konnten die Polyacrylamidsäulchen leicht ausgeblasen werden, die Proteine wurden 15 Min. mit gesätt. Amidoschwarzlösung in 5proz. Essigsäure angefärbt, und der überschüssige Farbstoff durch tagelanges Auswaschen mit 5proz. Essigsäure entfernt.

\* H. Paschinger, unveröffentlicht.

<sup>7</sup> H. Michl und A. Pastuszyn, Mikrochim. Acta [Wien] 1963, 880.

## Ergebnisse

Die Auftrennung der Überstände bei der Zentrifugierung durch Chromatographie war gut reproduzierbar. Abb. 1 bezieht sich auf einen

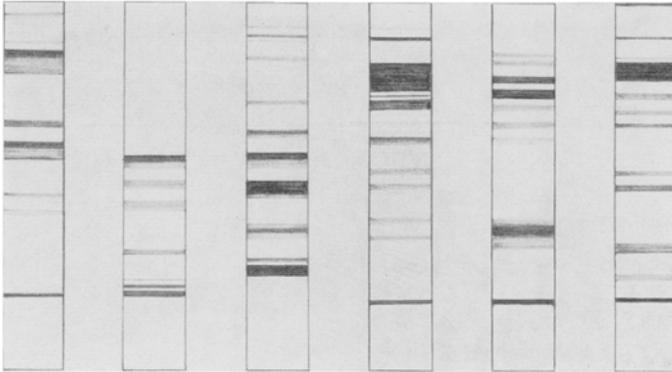


Abb. 2. Gel-Elektrophorese der Peaks von Abb. 1 (Zeichnung)

10 000g-Überstand; mit dem 105 000g-Überstand wurden ähnliche Ergebnisse erhalten. Die mit 0,01*m*-Puffer austretenden Bestandteile waren nicht adsorbiert worden. Relativ gut ausgeprägt war immer der Peak des mit 0,2*m*-Puffer eluierten Materials. Für alle im Bereich 0,01—0,3*m* eluierten Fraktionen lag das Verhältnis 210/260 über 10, d. h. der Gehalt an Nukleinsäuren war klein. Dagegen wurden für die letzte Fraktion (0,3*m*  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + *m*-NaCl) hohe Extinktionen bei 260  $\text{m}\mu$  gefunden.

Bei der Papierelektrophorese der chromatographischen Fraktionen wurden relativ scharfe Zonen in bestimmten Bereichen der Beweglichkeit gefunden, während bei der Papierelektrophorese des vollen 10 000g-Überstandes das Material sich mit einem breiten Maximum im Bereich der  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Proteine des menschlichen Serumproteinsystems über den ganzen Streifen verteilte. Schärfere Auftrennung wurde jedoch bei der Elektrophorese der gleichen Fraktionen in Poly-

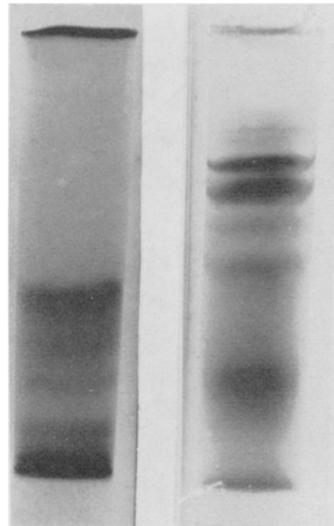


Abb. 3. Zwei Pherogramme nach Abb. 2 (0,06*m* und 0,3*m*)

acrylamid-Gel erhalten (Abb. 2 und 3).

Die Gel-Filtration des 105 000g-Überstandes (Abb. 4) läßt Proteine verschiedener Molekülgröße erkennen. Der erste Peak enthält Stoffe mit

einem Molekulargewicht von mehr als 200 000 (Fraktion 5—10). Dieses Material ist an Nukleinsäuren reich, wie aus der hohen Absorption bei 260 m $\mu$  zu schließen ist, doch ist das Verhältnis 210/260 für die einzelnen

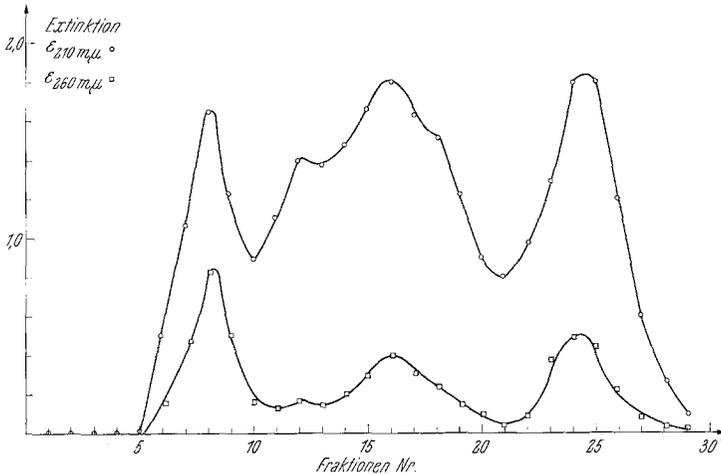


Abb. 4. Gel-Filtration des 105 000g-Überstandes

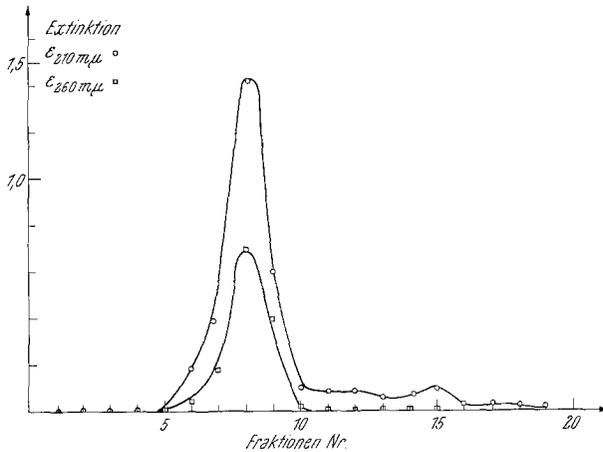


Abb. 5. Gel-Filtration des 105 000g-Pellets

Fraktionen nicht gleich. Ein weiterer Peak (Fraktionen 11—21) scheint ebenfalls heterogen zu sein; eine weitere Auftrennung wäre auf längeren Säulen wahrscheinlich möglich. Das Verhältnis 210/260 ist größer als im ersten Peak. Der dritte und letzte Peak (Fraktionen 22—29) besteht aus niedermolekularen Stoffen, die sich, wie der Versuch zeigt, durch Dialyse des Überstandes entfernen lassen.

Bei der Gel-Filtration des Mikrosomen-Pellets wurde ein relativ homogener Peak gefunden (Abb. 5). Er erscheint in dem Bereich, der dem ersten

Peak des 105 000g-Überstandes entspricht; dies war auf Grund der bekannten Molekülgröße der Mikrosomen zu erwarten. Charakteristisch ist der hohe Nukleinsäuregehalt der Bestandteile, der aber wieder für die einzelnen Fraktionen verschieden ist. Dieses letztere Ergebnis weist auf eine Möglichkeit hin, mit Sephadex G-200 auch noch Moleküle mit einem Molekulargewicht von mehr als 200 000 aufzutrennen.

### Diskussion

Algenproteine bieten aus mehreren Gründen Interesse. Durch den Vergleich von Proteinen aus verschiedenen Species können Schlüsse über die phylogenetische Entwicklung der Algen gezogen werden; dafür scheinen sich die Analysen der Aminosäurezusammensetzung<sup>8</sup> weniger zu eignen, die mit dieser Absicht durchgeführt wurden. Im besonderen ist der Vergleich der Enzymsysteme<sup>9</sup> verschiedener Algen wichtig; dafür ist natürlich auch die Isolierung der Enzyme wesentlich. Ein besonderes Problem ist die Entwicklung der Algenproteine während des Lebenszyklus der Zelle. Untersuchungen an *Chlorella pyrenoidosa* haben gezeigt, daß zwar der Gesamtproteingehalt vom Alter der Algen abhängt, daß sich aber die Zusammensetzung der Proteine aus Aminosäuren nur wenig ändert. Größere Unterschiede wurden in der Zusammensetzung von jungen und alten marinen Algen gefunden<sup>10</sup>. Auch für diese Untersuchungen scheint eine nähere Charakterisierung der Proteine wünschenswert.

Wasserlösliche Algenproteine stellen nach unseren Ergebnissen chromatographisch ein heterogenes System dar, und zwar sind gewiß sowohl elektrische Ladung als auch Molekülgröße unterschiedlich; die Differenzen in der Molekülgröße zeigen sich auch direkt bei der Gel-Filtration. Wie bei der DEAE-Chromatographie von tierischen Zellbestandteilen<sup>4</sup> wird auch ein großer Teil der Algenproteine erst bei höheren Molaritäten des Puffers aus der Säule eluiert. Ähnlich wurde auch stets eine starke Fraktion von Stoffen gefunden, die nicht an der DEAE-Cellulose absorbiert waren und daher mit 0,01*m*-Puffer aus der Säule hervortraten.

Eine weitere Übereinstimmung mit den tierischen Zellbestandteilen besteht darin<sup>4</sup>, daß die letzte (erst mit 0,3*m*-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + *m*-NaCl eluierte) Fraktion die Hauptmenge an Nukleinsäure enthält (Abb. 1). Nach Aussage der Gel-Filtration (Abb. 4) kommen im 105 000g-Überstand Nukleoproteine verschiedenen Molekulargewichtes vor, und es ist daher zu vermuten, daß die letzte chromatographische Fraktion in bezug auf Mole-

<sup>8</sup> L. Fowden, *Biochem. J.* **52**, 310 (1952).

<sup>9</sup> G. Jacobi, in: R. A. Lewin (Hsg.), *Physiol. and Biochem. of Algae*. Acad. Press, New York 1962.

<sup>10</sup> V. K. Pillai, *Proc. Indian Acad. Sci.* **B 45**, 43 (1957).

kulargewicht heterogen ist. Ein Teil der Nukleinsäure dieser Fraktion ist wahrscheinlich mikrosomalen Ursprungs, obwohl der Hauptteil der Mikrosomen durch die Säule festgehalten wird. Bei tierischen Zellbestandteilen besteht das Chromatogramm der Mikrosomen zum überwiegenden Teil aus Fraktionen, die bei hohen Molaritäten eluiert werden<sup>4</sup>.

Die Heterogenität auch der einzelnen DEAE-chromatographischen Fraktionen wurde durch die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese nachgewiesen. Die Anzahl der dabei gefundenen Subfraktionen und ihre Verteilung sind für die einzelnen Fraktionen charakteristisch. Die Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit können nicht nur durch Unterschiede in der elektrischen Ladung, sondern auch im Molekulargewicht bedingt sein; die größeren Moleküle werden vom Polyacrylamidgel durch eine Art Siebwirkung zurückgehalten. Für die stärksten Subfraktionen der einzelnen Fraktionen ist eine Zuordnung zu den Banden im Pherogramm des gesamten 105 000g-Überstands möglich.

Vermutlich ist die Zahl der verschiedenen Eiweißkörper im vorliegenden System recht groß. Die Auftrennung nach den hier erwähnten Verfahren bietet die Möglichkeit zu einer weiteren Charakterisierung dieser Eiweißkörper.

Wir danken Herrn Prof. Dr. *E. Broda* für sein Interesse, dem Bundeskanzleramt — Verstaatlichte Unternehmungen (Sektion IV) für finanzielle Förderung bezüglich Sachausgaben, und der Ludwig-Boltzmann-Gesellschaft für Unterstützung des einen von uns (*B. R.*).