

# Solubilisierung von „High Potential“ Cytochrom b-559 aus Spinat-Chloroplasten

Subilization High Potential Cytochrome b-559 from Spinach Chloroplasts

Hans-Joachim Lach und Peter Böger

Fachbereich Biologie, Universität Konstanz

(Z. Naturforsch. 30 c, 628–633 [1975]; eingegangen am 28. Mai/30. Juni 1975)

Cytochrome b-559, High-Potential, Low-Potential

1. Ethanol-extracted spinach chloroplasts were carefully sonified in a mixture of buffered urea, TRITON X-100 and dithiothreitol. This procedure solubilized the membrane-bound b-type cytochromes 559 and 563 to approx 90%. The crude extract contained both the high-potential (HP) and the low-potential form (LP) of cytochrome b-559 in a molar ratio of 1:1.
2. Strong sonification doubled the amount of low potential cytochrome b-559 in the extract. Therefore, it is assumed that Cyt b-559 HP was completely converted into the low-potential form.
3. Cyt b-563 was solubilized in the same concentration by both methods.
4. In the same medium (see No. 1), cytochrome f (= Cyt c-554) was dissolved by strong sonification only and is then essentially present in the extract in a dithionite-reducible form.

## Einleitung

Chloroplasten höherer Pflanzen enthalten 3 verschiedene Cytochrome: Cyt f (= Cyt c-554), Cyt b-559 und Cyt b-563 (= Cyt b<sub>6</sub>) \*.

Die Isolierung sämtlicher Cytochrome ist schwierig, da sie fest an die Thylakoidstruktur des Chloroplasten gebunden sind. Für Cyt f liegen jedoch inzwischen befriedigende Befunde bezüglich seiner Isolierung vor<sup>1,2</sup>. Aus Algen ist es in reiner Form dargestellt worden (Übersichten bei<sup>3</sup>), hier löst es sich vergleichsweise leicht aus der Membran. Cyt b-559 findet seit längerem das Interesse verschiedener Bearbeiter, da es in zwei verschiedenen Redoxnormalpotentialen im Chloroplasten vorliegt, in einer „high-potential“ Form (HP) mit einem Redoxpotential von ca. +350 mV<sup>4-7</sup> (Hydrochinon-reduzierbar) und in einer „low potential“ Form (LP) mit einem Redoxpotential von ca. +80 mV<sup>4,8,9</sup> (Ascorbat-reduzierbar); einige Autoren berichten sogar von einer noch negativeren LP-Form<sup>4,10,11</sup>, die nur mit Na-Dithionit zu reduzieren ist. Die Redoxeigenschaften wurden bisher ausschließlich durch spektroskopische Messungen an den Membranen, nicht aber an dem isolierten Cytochrom gefunden (Übersicht insbesondere hinsichtlich der Redoxeigenschaften der b-Cytochrome in situ bei

Cramer u. Horton<sup>30</sup>). Die Cytochrome b-559 und b-563 konnten erst kürzlich von der Arbeitsgruppe um Wasserman isoliert werden<sup>12-14</sup>. Ihre Methodik wurde übernommen und weiterentwickelt.

Für einen Übergang der beiden Redoxstufen ineinander gibt es verschiedene Anhaltspunkte. So bildet sich Cyt b-559HP in ergrünenden Chloroplasten erst in einer späteren Entwicklungsphase<sup>15-17,36</sup> und wird dabei möglicherweise in der Chloroplastenmembran aus der LP-Form gebildet<sup>16</sup>. Eine *in vivo* Umwandlung der HP-Form in die LP-Form wurde von Cramer *et al.*<sup>22</sup> postuliert. Gemäß ihrem Photosyntheschema findet eine Photoumwandlung von Cyt b-559HP nach Cyt b-559LP statt, mit einer Rückreaktion im Dunkeln.

In der Thylakoidmembran wird Cyt b-559HP durch diverse Behandlungen in die LP-Form überführt, und zwar durch organische Lösungsmittel bei der Extraktion von Lipiden<sup>18-20</sup> (durch Zugabe von Plastochinon A und  $\beta$ -Carotin kann die LP-teilweise wieder in die HP-Form überführt werden). Weiterhin entsteht Cyt b-559LP durch Einwirkung von Detergentien, Erwärmen, Ultraschallbehandlung und sogenannte „chaotropic agents“, wie z.B. Trijodphenol, Carbonylcyanid-*p*-trifluormethoxyphenylhydrazon (= FCCP)<sup>10,21-23</sup>.

Requests for reprints should be sent to Prof. Dr. P. Böger, or H.-J. Lach, Lehrstuhl Physiologie und Biochemie der Pflanzen, Fachbereich Biologie, Universität Konstanz, D-7750 Konstanz.

\* Cyt, Cytochrom, der nachfolgende Buchstabe gibt den Typ an, die darauffolgende Zahl das Absorptionsmaximum der  $\alpha$ -Bande. HP, „high-potential“ Form von Cyt b-559; LP, „low-potential“ Form von Cyt b-559; TRIS, N-Tris(hydroxymethyl)-aminomethan.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Somit ist verständlich, daß Cyt b-559HP nur in nichtbehandelten, isolierten Chloroplasten durch spektroskopischen Nachweis gefunden wurde; denn die Darstellung von Chloroplastenpartikeln erfordert Eingriffe wie oben aufgeführt, wonach Cyt b-559 nur noch in der LP-Form vorliegt<sup>24, 25</sup>. Demgemäß fand man bisher bei der Isolierung von Cyt b-559 nur die LP-Form<sup>12, 13</sup>. Wie im folgenden dargestellt, gelang es uns, Cyt b-559HP in löslicher Form zu erfassen.

### Methodik

Sämtliche Präparationsarbeiten werden bei einer Temperatur von 4–6 °C ausgeführt.

**Chloroplastenpräparation:** Ca. 6 kg gewaschener Spinat (*Spinacia oleracea* L., Sorte „Atlanta“; eigene Freilandanzucht) wird in einer Dreiwalzenmühle mit ca. 1000 bis 1500 ml eiskalter 0,35 M NaCl/0,02 M TRIS-HCl-Lösung, pH 8,0, zerfasert. Der resultierende Brei wird mit Hilfe einer Presse durch ein Nylonnetz mit 100 µm Maschenweite gepreßt. Der Preßsaft (ca. 6 l) wird 10 min bei  $11\,000 \times g$  zentrifugiert. Der Rückstand wird in ca. 800 ml 0,035 M NaCl, abgepuffert mit 0,02 M TRIS-HCl, pH 8,0, suspendiert, wodurch die Chloroplasten aufgebrochen werden. Man zentrifugiert die Zellreste 1 min bei  $2500 \times g$  ab und sodann die Chloroplastenfragmente (= Typ E, Nomenklatur nach Hall<sup>26</sup>) 15 min bei ca.  $28\,000 \times g$  (der Überstand ist grün und trübe). Das so gewonnene Chloroplastenmaterial wird in 0,035 M NaCl/0,02 M TRIS-HCl, pH 8,0, suspendiert und mit einem Chlorophyllgehalt von 4 bis 5 mg/ml mittels flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert.

#### Lösung von Cyt b-559 und Cyt b-563 aus den Chloroplastenfragmenten

Die nächsten Isolationschritte erfolgen nach modifizierten Angaben von Garewal *et al.*<sup>12</sup> und Stuart und Wasserman<sup>14</sup>. Von der Chloroplastensuspension werden etwa 300 mg Chlorophyll für einen Isoliergang verwendet.

Zu 10 ml Suspension werden 90 ml Äthanol (eiskalt, 96-prozentig, vergällt mit 1% Petroläther) gegeben und im Waring Blendor (31 Stahlgefäß) gemixt. Die Geschwindigkeit des Mixers wird dabei innerhalb von 10 sec auf ca. 200 V hochgeregelt, hier 2–3 sec belassen, dann abgebremst.

Die äthanolische Suspension wird so schnell wie möglich zentrifugiert (wenige Sekunden bei  $8000 \times g$ ). Bei diesem ersten Extraktionsschritt werden bereits über 90% des Gesamtchlorophylls

entfernt. Der resultierende Rückstand wird ein zweites Mal, diesmal mit ca. 300 ml Äthanol (absolut, p. a.) suspendiert, wie bei der Erstextraktion gemixt und dann zentrifugiert. Als Mixer erwies sich hier ein Modell von CENCO mit einem 1 l Gefäß als geeignet.

Der Rückstand wird anschließend zweimal mit ca. 300 ml 0,05 M TRIS-HCl, pH 8,0, vorsichtig in einem 300 ml Gewebehomogenisator (n. Potter-Elvehjem) mit einem Teflonpistill homogenisiert und wie oben zentrifugiert. Bei guter Extraktion muß der Rückstand jetzt dunkelbraun sein und darf keinen Grünstich mehr haben.

Man suspendiert den Rückstand in 30 ml kaltem Lösungsgemisch von 4 M Harnstoff, 2% TRITON X-100, 2 mM Dithiothreitol, 50 mM TRIS-HCl, pH 8,0 (so ergibt sich ein Proteingehalt von 30–40 mg/ml; Bestimmung nach Lowry *et al.*<sup>27</sup>). Die Suspension wird nun 2 min unter Eiswasserkühlung in einem Branson Becher aus Edelstahl ultraschallt. Das Volumen der zu beschallenden Lösung muß zwischen 15 und 18 ml liegen (unter 15 ml ist die Energieübertragung auf die eingesetzte Menge Protein zu hoch). Wichtig ist, daß die vom Ultraschallgerät abgegebene Leistung so klein wie möglich gehalten wird, um das Cyt b-559HP nicht durch Ultraschall in die LP-Form zu überführen. Das sind für den BRANSON Sonifier Modell J-17 A, 300 W max. Leistung, höchstens Stufe 1 bis 2 (entsprechend 82–95 VA) bei Modell B-12, 150 W max. Leistung, höchstens Stufe 4. Die Temperatur steigt dabei nicht über +5 °C an.

Die beschallte Lösung wird 60 min bei  $48\,000 \times g$  zentrifugiert. Danach befinden sich die in Tab. II aufgeführten Cytochrome im Überstand. Dieser wird im weiteren Verlauf der Arbeit als Rohextrakt bezeichnet, er ist dunkelbraun und klar. Der Rückstand beträgt nur 1–2% (w/w), bezogen auf die beschallte Suspension.

Von diesem Rohextrakt werden Differenzspektren nach der Methode von Hind und Nakatani<sup>9</sup> aufgenommen (Perkin-Elmer Spektrophotometer, Modell 124; Schreiber-Empfindlichkeit 0–0,1 Extinktion für 25 cm Papierbreite).

Eine weitere Reinigung des Rohextraktes wird zunächst nicht durchgeführt, da nur im Rohextrakt ca. die Hälfte des Cyt b-559 in der HP-Form vorliegt. Bislang verringert es sich während der weiteren Reinigung bis zu einem Zehntel gegenüber neun Zehntel der LP-Form. Darüber wird an anderer Stelle berichtet. Cyt b-559 wurde von uns in elektrophoretisch reiner und enzymologisch aktiver Form isoliert (unveröffentlichte Befunde).

*Instrumente*

Die Homogenisierung des Spinats erfolgte in der Kälte in einem Laborwalzwerk mit 3 Hartporzellanwalzen (Walzengröße  $250 \times 80$  mm), Fabrikat Asra, Modell SDW 73. Der hiervon erzeugte Spinatbrei wurde in einer vollhydraulischen Hochdruckpresse, Fabrikat Hafico, Füllgutinhalt 2 l, ausgepreßt. Es wird bis zu einem kurzfristigen Druck von 50–100 atm gepreßt.

*Chemikalien*

Chemikalien wurden in p. a.-Qualität von Merck, Darmstadt, bezogen, Harnstoff p. a. in Spezialqualität für biochemische Zwecke (Pb 1 ppm; Fe, Cu 0,2 ppm) und TRITON X-100 p. A. (speziell gereinigt für die Szintillationsmeßtechnik) von Serva, Heidelberg, sowie Dithiothreitol von Calbiochem, Luzern.

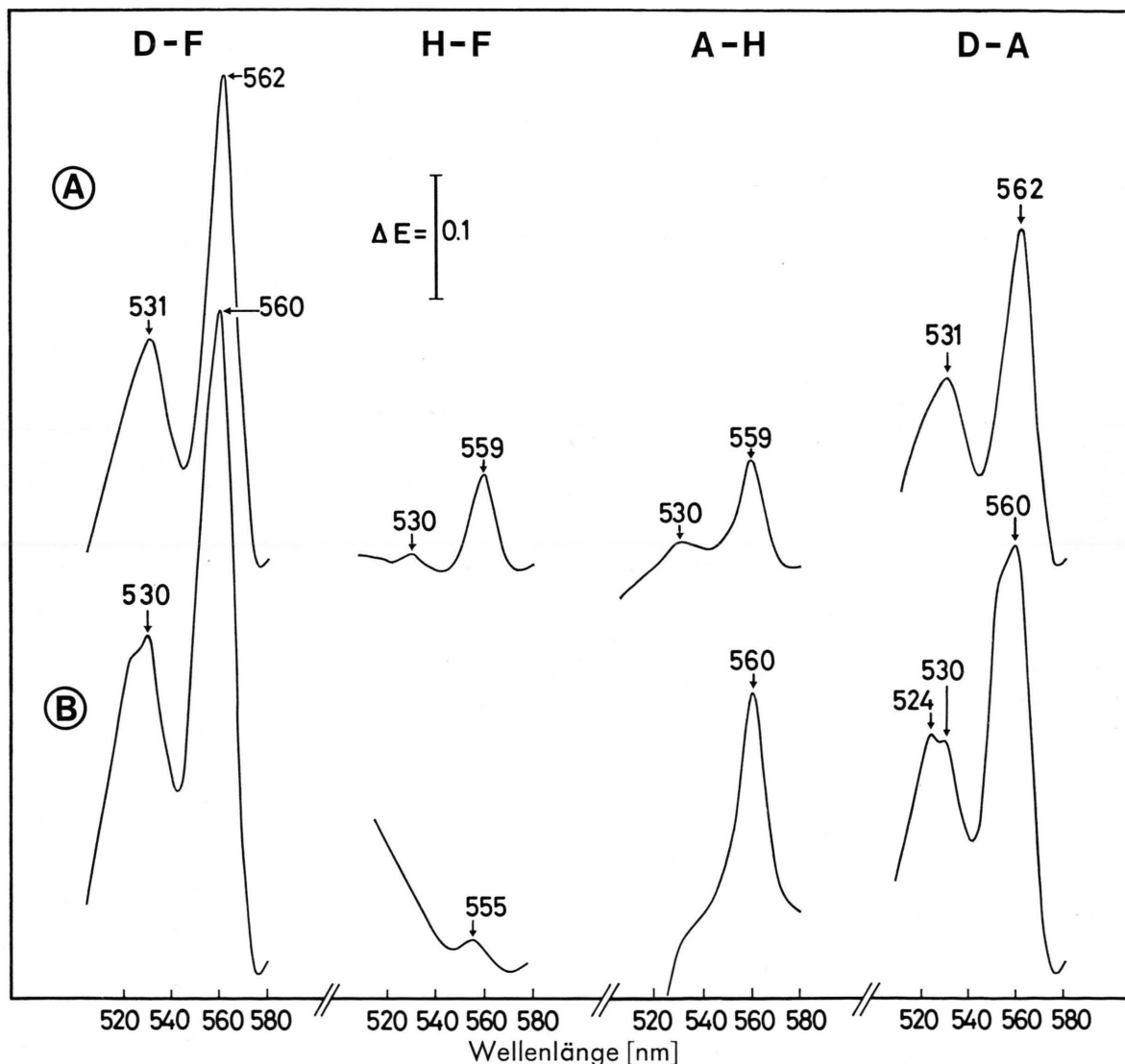


Abb. 1. Differenzspektren des Rohextraktes nach Beschallung mit 95 VA (obere Bildreihe, A) bzw. 228 VA (Reihe B). Die abgegebene (Schein)leistung (in VA ausgedrückt) wurde mit dem Oszilloskop Tektronix 465 und vorgeschalteten Hochspannungstastkopf Tektronix P6015 gemessen. Die wiedergegebenen Leistungswerte ergaben sich aus Umrechnung der Oszilloskopwerte auf die eines Zeigerinstruments. Die Maxima der reinen isolierten Cytochrome im  $\alpha$ - und  $\beta$ -Bereich liegen bei Cyt f: 554/522 nm<sup>28</sup>; Cyt b-559: 559/530 nm<sup>12</sup> (und unveröffentlichte Befunde); Cyt b-563; 563/536 nm<sup>14</sup>, 563/533 (eigene Befunde). Differenzspektren: D-F = Na-Dithionit/K-hexacyanoferrat-III; H-F = Hydrochinon/K-hexacyanoferrat-III; A-H = Na-Ascorbat/Hydrochinon; D-A = Na-Dithionit/Na-Ascorbat.

## Ergebnisse

Abb. 1 zeigt den Vergleich der Differenzspektren des Rohextraktes nach Ultraschallbehandlung bei Stufe 2 (95 VA) gegenüber Stufe 7 (228 VA) mit dem BRANSON Sonifier J-17 A.

Man erwartet bei den Differenzspektren Dithionit gegenüber K-hexacyanoferrat-III (D – F) die Gesamtcytochrome, bei Hydrochinon/K-hexacyanoferrat-III (H – F) Cyt b-559HP und Cyt f, bei Ascorbat/Hydrochinon (A – H) Cyt b-559LP und bei Dithionit/Ascorbat (D – A) Cyt b-563 (ausführliche Beschreibung siehe Hind und Nakatani<sup>9</sup>). Die Anwesenheit einer nur durch Dithionit reduzierbaren Form von Cyt b-559 wird nicht angenommen, da es erst bei sehr drastischer Behandlung entsteht<sup>10</sup>. Außerdem liegt der Gehalt von Dithionit-reduzierbarem Cyt b-559 selbst bei *reinem* isoliertem Cyt b-559 immer weit unter 10% (unveröffentlichte Befunde). Sehr kleine Mengen würden allerdings im D – A-Spektrum von Cyt b-563 und Dithionit-reduzierbarem Cyt f überlagert werden.

Zwischen den beiden Beschallungsintensitäten zeigen sich wesentliche Unterschiede:

**Beschallung mit 95 VA:** Cyt f wird bei schwacher Beschallung und der hier geschilderten Methodik nicht solubilisiert. Die Absorptionsmaxima des Gesamtspektrums (D – F) bei 562 nm und 531 nm deuten bereits an, daß hier nur b-Cytochrome abgelöst wurden. Das Differenzspektrum H – F zeigt kein Cyt f an, sondern nur Cyt b-559HP. Die Absorptionsmaxima stimmen mit denen des reinen isolierten Cyt b-559 überein.

**Beschallung mit 228 VA:** Bei starker Beschallung wird auch Cyt f solubilisiert: Im D – F-Spektrum liegt hier eine Schulter im  $\beta$ -Bereich, im H – F-Spektrum wird es durch das Absorptionsmaximum der  $\alpha$ -Bande angezeigt. Die durch Hydrochinon reduzierbare Menge Cyt f ist sehr klein, der Rest wurde durch die Beschallung derart verändert, daß er nur noch durch *Dithionit* reduzierbar ist und sich im Spektrum (D – A) als Maximum im  $\beta$ -Bereich (524 nm) und Schulter im  $\alpha$ -Bereich (ca. 556 nm) zeigt. (Die Absorptionsmaxima stimmen nicht mit denen des isolierten Cyt f überein, da hier das Spektrum durch Cyt b-563 überlagert ist.) Im Gegensatz zur Beschallung bei 95 VA wird kein Cyt b-559HP mehr gefunden.

In Tab. I wird der Gehalt der einzelnen Cytochrome im Chloroplasten mit dem im Rohextrakt

Tab. I. Vergleich des Gehaltes verschiedener Cytochrome (in nmol) in Spinatchloroplasten und daraus präpariertem Rohextrakt.

Cytochrom	Spinat-chloroplasten (300 mg Chlorophyll)*	Rohextrakt	
		Beschallung mit 95 VA	Beschallung mit 228 VA
1. Cytochrom f	260	—	40
2. Cytochrom b-559	500	340 **	360
3. Cytochrom b-563	580	500	620 ***
Gesamtcytochrome im Rückstand	—	35	20

Zur Beurteilung der gesamten Cytochromkonzentration ist zu bedenken, daß diese durch Differenzspektren ermittelt wurde. Cytochromanteile, die im Verlauf der Präparation ihre Redox-eigenschaft verlieren, werden hierbei nicht erfaßt (vgl. <sup>9</sup>). Unvermeidliche präparative Verluste bei der Gewinnung des Rohextrakts betrugen etwa 10%. — Die Spinatsorte Atlanta hat einen sehr hohen Chlorophyllgehalt, wodurch speziell der Cyt f-Gehalt gering erscheint. Allgemein schwankt das Verhältnis Chlorophyll/Cyt f stark<sup>21</sup> und hängt von den Beleuchtungsverhältnissen ab<sup>37</sup>.

\* Die Bestimmung der Cytochrome im Chloroplasten wurde nach leichter Abänderung der Methode von Bendall *et al.*<sup>34</sup> vorgenommen: Die Chloroplasten werden mit einem Medium aus 0,33 M Saccharose, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, 50 mM TRIS-HCl, pH 8,0, und 1% Triton X-100 (w/v) auf eine Chlorophyllkonzentration von ca. 170 µg/ml verdünnt. Weiter verfährt man nach der Methode von Hind und Nakatani<sup>9</sup> (Cyt b-559 liegt nach Tritoneinwirkung in der Thylakoidmembran nur noch in der LP-Form vor und wird im A – H Differenzspektrum erfaßt).

\*\* Cyt b-559HP und Cyt b-559LP zusammen.

\*\*\* Mit Dithionit-reduzierbarem Cyt f.

verglichen. Die Werte zeigen starke Solubilisierung von Cyt b-559 auch bei geringer Beschallung an. Der Gehalt im Zentrifugierückstand an b-Cytochromen liegt unter 5%.

Aus Tab. II sind die Verhältnisse der einzelnen Cytochrome bei beiden Beschallungsstärken zu sehen: Die Konzentration der einzelnen Cytochrome innerhalb der Lösung wurde in Anlehnung an Anderson *et al.*<sup>29</sup> bestimmt, indem für jedes Spektrum die Extinktionsdifferenz jeweils zwischen dem Maximum bei 554 nm, 559 nm, bzw. 563 nm relativ zu einer Grundlinie, welche die Minima rechts und links der  $\alpha$ -Bande verbindet, bestimmt wird (viele Autoren verzichten auf diese Grundlinie und ermitteln die Absorptionsdifferenz zwischen dem Maximum und einem Minimum; vgl. die unten angegebenen Koeffizienten). Als differentieller molarer Extinktionskoeffizient (reduziert-oxidiert) wurde bei allen



Tab. II. Konzentration der Cytochrome im Rohextrakt nach Ultraschallbehandlung mit 95 VA bzw. 228 VA.

Cytochrom	Differenz-Spektrum	Beschallung mit 95 VA	Beschallung mit 228 VA
Cyt f	H-F	—	0,9 $\mu\text{M}$
Cyt b-559HP	H-F	4,0 $\mu\text{M}$	—
Cyt b-559LP	A-H	4,1 $\mu\text{M}$	8,5 $\mu\text{M}$
Cyt b-563	D-A	11,9 $\mu\text{M}$	14,8 $\mu\text{M}$ *
Gesamtcytochrome	D-F	18,3 $\mu\text{M}$	24,0 $\mu\text{M}$

\* Eingeschlossen ist der Cytochrom-f-Anteil, der nur noch durch Dithionit reduzierbar ist.

Cytochromen  $2,0 \times 10^4 (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$  benutzt. Dieser Wert reicht für den quantitativen Vergleich zwischen den beiden Beschallungsintensitäten aus. Für Cyt f liegt der genaue Wert bei  $2,06 \times 10^4 (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}; 554 - 538 \text{ nm})$  bzw. bei  $2,3 \times 10^4 (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}; 554 - 565 \text{ nm})$ <sup>31</sup>. Für Cyt b-559 wurde ein Wert von  $2,0 \times 10^4 (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}; 560 - 575 \text{ nm})$  benutzt, der auf Abschätzungen von Lundegård<sup>33</sup> zurückgeht. Für Cytb-563 wurden  $2,07 \times 10^4 (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}; 563 - 543 \text{ nm})$  bzw.  $2,44 \times 10^4 (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}; 563 - 575 \text{ nm})$  berichtet<sup>31</sup>.

Werden nicht alle wesentlichen Parameter wie z. B. Temperatur, schnelle Äthanolextraktion, schonende TRIS-Waschung der äthanolextrahierten Partikel genau eingehalten, so kann auch schon bei schwacher Beschallung Cytochrom f gelöst werden. Meistens findet man aber dennoch Cytb-559 in der HP-Form, was sich als Verschiebung des Absorptionsmaximums im  $\alpha$ -Bereich und als Maximum im  $\beta$ -Bereich andeutet (siehe Abb. 2). Eine Bestimmung der Konzentration von Cytb-559HP ist dann wegen der Überlagerung des Spektrums durch Cyt f unsicher.

### Diskussion

Aus Tab. II geht hervor, daß mit der hier geschilderten Methode HP-Cyt b-559 : LP-Cyt b-559 im molaren Verhältnis von 1:1 isoliert wird. Die Angaben über die Verhältnisse der beiden Redoxnormal-Potentiale im Chloroplasten sind bislang noch widersprüchlich. Einerseits wird aus spektroskopischen Befunden an den Membranen geschlossen, daß der größte Teil des Cyt b-559 in der HP-Form vorliegt<sup>10, 22</sup> (dies wird durch eine Arbeit von Giaquinta *et al.*<sup>35</sup> unterstützt: 70 – 75% HP-, 25 – 30% LP-Form), andererseits finden Huzisige und Takimoto<sup>32</sup> in Granasuspen-

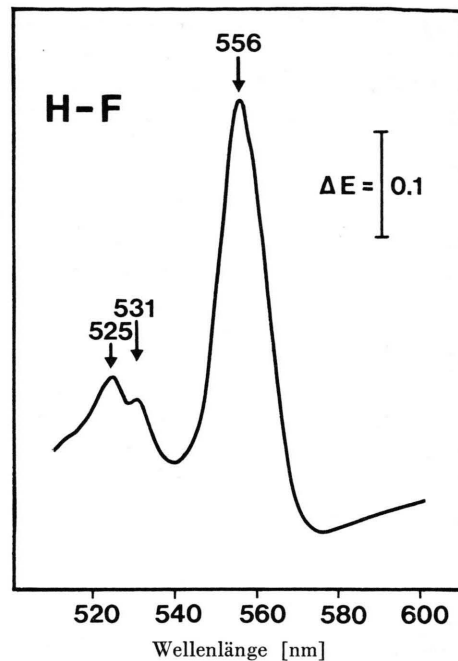


Abb. 2. Differenzspektrum eines Rohextraktes nach Ultraschallbehandlung mit 95 VA. Es wurden nicht alle Versuchsbedingungen (s. Text) für eine schonende Präparation eingehalten. Hierbei wurde Cyt f neben Cyt b-559HP gelöst. Die Absorptionsmaxima können sich je nach Präparation um etwa 1 nm verschieben. Die durchschnittliche Wellenlänge aus 7 Präparationen betrug 555,7/530,6/524,6 nm.

sionen von Spinat (= class II Chloroplasten oder Typ C nach Hall<sup>26</sup>) sehr wenig Hydrochinon-reduzierbares Cyt b-559 (58%) und sogar 33% Dithionit-reduzierbare Form. Bei *Hordeum vulgare* berichten Plesničar und Bendall<sup>15</sup> von einem molaren Verhältnis HP:LP = 1:1, und zwar je 2,5 nmol/g Blattfrischgewicht. In etiolierten Blättern ist noch kein Cyt b-559HP enthalten, sondern nur die LP-Form in einer Konzentration von 5,7 nmol/g Frischgewicht. Im allgemeinen wird Cyt b-559HP nach der Methode von Bendall *et al.*<sup>34</sup> oder Henningsen und Boardman<sup>36</sup> bestimmt. Diese ist von der Auswertung her problematisch und führt zu schwankenden Werten. Wir finden damit in Spinatchloroplasten ein Verhältnis von ca. 2/3 HP- und 1/3 LP-Form.

Plesničar und Bendall<sup>21</sup> berichteten erstmals darüber, daß Chloroplastenbehandlung mit TRITON X-100 Cyt b-559HP in Cyt b-559LP umwandelt. Dieser Befund wurde von vielen Arbeitsgruppen bestätigt. Unsere Ergebnisse stehen dennoch nicht im Widerspruch hierzu, da wir das Detergenz erst einsetzen, wenn das Chlorophyll bereits aus dem Chloroplasten herausgelöst wurde. Die Wasserman-

Gruppe findet während des Präparationsganges von Cyt b-559 nicht die HP-Form. Möglicherweise wurde diese übersehen, da sie keine stufenweisen Differenzspektren während des Präparationsganges aufnahmen. Auf eine nicht optimale Präparation bezüglich der HP-Form deutet bei ihnen die Anwesenheit einer sogenannten „trouble fraction“ hin. Diese Fraktion findet man nach unseren Erfahrungen, wenn die äthanolextrahierten Partikel einer TRIS-

Waschung im Mixer (hier starke Schaumbildung) und nicht im Homogenisator unterzogen wurde.

Die Methodik der genannten Erstbearbeiter wurde demnach so verbessert, daß nun auch die „high-potential“ Form des Cytochrom b-559 in Lösung gebracht werden kann.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt (Sonderforschungsbereich 138).

- <sup>1</sup> J. Singh u. A. R. Wasserman, *J. Biol. Chem.* **246**, 3532 [1971].
- <sup>2</sup> N. Nelson u. E. Racker, *J. Biol. Chem.* **247**, 3848 [1972].
- <sup>3</sup> M. D. Kamen, K. M. Dus, T. Flatmark u. H. de Klerk, *Electron and Coupled Energy Transfer in Biological Systems* (T. E. King u. M. Klingenberg, eds.), p. 243, Dekker Inc., New York 1971. — R. Lemberg u. J. Barret, *Cytochromes*, p. 122 ff., Acad. Press, London-New York 1973. — H.-J. Lach, H. G. Ruppel u. P. Böger, *Z. Pflanzenphysiol.* **70**, 432 [1973]. — H.-J. Lach u. P. Böger, *Z. Pflanzenphysiol.* **72**, 427 [1974].
- <sup>4</sup> D. S. Bendall, *Biochem. J.* **109**, 46p [1968].
- <sup>5</sup> I. Ikegami, S. Katoh u. A. Takamiya, *Biochim. Biophys. Acta* **162**, 604 [1968].
- <sup>6</sup> N. K. Boardman, J. M. Anderson u. R. G. Hiller, *Biochim. Biophys. Acta* **234**, 126 [1971].
- <sup>7</sup> D. B. Knaff u. D. I. Arnon, *Biochim. Biophys. Acta* **226**, 400 [1971].
- <sup>8</sup> H. N. Fan u. W. A. Cramer, *Biochim. Biophys. Acta* **216**, 200 [1970].
- <sup>9</sup> G. Hind u. N. Y. Nakatani, *Biochim. Biophys. Acta* **216**, 223 [1970].
- <sup>10</sup> K. Wada u. D. I. Arnon, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **68**, 3064 [1971].
- <sup>11</sup> B. L. Epel u. W. L. Butler, *Biophys. J.* **12**, 922 [1972].
- <sup>12</sup> H. S. Garewal, J. Singh u. A. R. Wasserman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **44**, 1300 [1971].
- <sup>13</sup> H. S. Garewal u. A. R. Wasserman, *Biochemistry* **13**, 4063 [1974].
- <sup>14</sup> A. L. Stuart u. A. R. Wasserman, *Biochim. Biophys. Acta* **314**, 284 [1973].
- <sup>15</sup> M. Plesničar und D. S. Bendall, *Proc. II Int. Congr. Photosynth. Res.* (G. Forti, ed.), **Vol. III**, p. 2367, W. Junk N. V. Publ., The Hague 1972.
- <sup>16</sup> F. R. Whatley, P. Gregory, B. G. Haslett u. J. W. Bradbeer, *Proc. II Int. Congr. Photosynth. Res.* (G. Forti, ed.), **Vol. III**, p. 2375, W. Junk N. V. Publ., The Hague 1972.
- <sup>17</sup> N. K. Boardman, J. M. Anderson, R. G. Hiller, A. Kahn, P. G. Roughan, T. E. Treffry u. S. W. Thorne, *Proc. II Int. Congr. Photosynth. Res.* (G. Forti, ed.), **Vol. III**, p. 2265, W. Junk, N. V. Publ., The Hague 1972.
- <sup>18</sup> R. P. Cox u. D. S. Bendall, *Biochim. Biophys. Acta* **347**, 49 [1974].
- <sup>19</sup> S. Okayama u. W. L. Butler, *Plant Physiol.* **49**, 769 [1972].
- <sup>20</sup> D. Sofrová u. D. S. Bendall, *Proc. II Int. Congr. Photosynth. Res.* (G. Forti, ed.), **Vol. I**, p. 561, W. Junk N. V. Publ., The Hague 1972.
- <sup>21</sup> M. Plesničar u. D. S. Bendall, *Biochim. Biophys. Acta* **216**, 192 [1970].
- <sup>22</sup> W. A. Cramer, H. N. Fan u. H. Böhme, *J. Bioenerg.* **2**, 289 [1971].
- <sup>23</sup> R. P. Cox u. D. S. Bendall, *Biochim. Biophys. Acta* **283**, 124 [1972].
- <sup>24</sup> B. Ke, L. P. Vernon u. T. H. Chaney, *Biochim. Biophys. Acta* **256**, 345 [1972].
- <sup>25</sup> N. K. Boardman, *Biochim. Biophys. Acta* **283**, 469 [1972].
- <sup>26</sup> D. O. Hall, *Nature New Biol.* **235**, 125 [1972].
- <sup>27</sup> O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr u. R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 [1951].
- <sup>28</sup> J. Singh u. A. R. Wasserman, *J. Biol. Chem.* **246**, 3532 [1971].
- <sup>29</sup> J. M. Anderson, Than-Nyunt u. N. K. Boardman, *Arch. Biochem. Biophys.* **155**, 436 [1973].
- <sup>30</sup> W. A. Cramer u. P. Horton, *The Porphyrins* (D. Dolphin, ed.), Acad. Press, New York 1975, im Druck.
- <sup>31</sup> N. Nelson u. J. Neumann, *J. Biol. Chem.* **247**, 1817 [1972].
- <sup>32</sup> H. Huzisige u. N. Takimoto, *Plant Cell Physiol.* **15**, 1099 [1975].
- <sup>33</sup> H. Lundegård, *Physiol. Plant.* **15**, 390 [1962].
- <sup>34</sup> D. S. Bendall, H. E. Davenport u. R. Hill, *Methods in Enzymology* (A. San Pietro, ed.), **Vol. XXIII**, p. 327, Acad. Press, New York 1971.
- <sup>35</sup> R. Giaquinta, R. A. Dilley, B. J. Anderson u. P. Horton, *Bioenergetics* **6**, 167 [1974].
- <sup>36</sup> K. W. Henningsen u. N. K. Boardman, *Plant Physiol.* **51**, 1117 [1973].
- <sup>37</sup> N. K. Boardman, J. M. Anderson, S. W. Thorne u. O. Björkman, *Carnegie Year Book* **71**, 107, Wash. DC, [1972].