

## Isolierung und Eigenschaften der Zellhülle der Grünalge *Chlorella fusca*

Isolation and Properties of the Cell Envelope of the Green Alga *Chlorella fusca*

W. Hülsen und D. Kubin

Schule für Kerntechnik, Kernforschungszentrum Karlsruhe

(Z. Naturforsch. **30 c**, 684–686 [1975]; eingegangen am 25. Juni 1975)

*Chlorella*, Cell Envelope, Isolation, Hexose Uptake, Fatty Acid Composition

*Chlorella* cell envelopes were isolated by a mechanical procedure. The obtained morphological structure shown in an EM-picture has a mean density of  $\rho = 1.42$ . A characteristic chemical property of the envelope is the percentage of mono- and di-unsaturated  $C_{18}$ -fatty acids which is considerably higher than that of intact cells. With  $^{14}C$  labelled sugars a selectivity of the hexose uptake could be shown, galactose uptake amounting only to about one fifth that of glucose and mannose. The uptake shows a temperature maximum. Part of the  $^{14}C$  registered after a 30 min uptake period is released by high concentration of unlabelled glucose, 20% are irreversibly fixed.

Im Rahmen unserer Arbeit über den Stofftransport bei *Chlorella* wurden einige strukturelle und funktionelle Aspekte der Zellhülle untersucht. Wir definieren Zellhülle als diejenige morphologische Struktur, die durch mechanisches Aufbrechen junger Chlorellen erhalten wird und sich durch Zentrifugation in einem Saccharose-Gradienten im Bereich 0,5–0,6 M anreichern läßt. Solche Hüllen sind, im Phasenkontrast-Mikroskop betrachtet, optisch leer. Sie gleichen den *Chlorella*-Zellwänden, die Northcote *et al.*<sup>1</sup> auf ihre Struktur und chemische Zusammensetzung hin untersucht haben. Die dazu verwendeten Zellen stammten aus einer Tageslichtkultur eines nicht näher bezeichneten *Chlorella*-Stammes. Im Gegensatz zu diesen Autoren verwendeten wir junge Zellen einer Synchronkultur eines definierten *Chlorella*-Stammes. Offenbar handelt es sich sowohl bei den Zellwänden, die Northcote *et al.*<sup>1</sup> verwendeten, wie bei unseren Zellhüllen um eine Zellwand-Plasmalemma-Fraktion. 1969 teilten wir mit<sup>2</sup>, daß *Chlorella*-Hüllen Glucose irreversibel fixieren können. Im folgenden wird beschrieben, wie diese Zellhüllen reproduzierbar zu isolieren sind, wobei gewisse enzymatische Eigenschaften, die anscheinend für den Stofftransport wichtig sind, erhalten bleiben.

Junge Chlorellen können verschiedene im Nährmedium angebotene Monosaccharide anreichern<sup>3</sup> und zeigen bei niedrigen Zuckerkonzentrationen

deutlich Selektivität. Es konnte vermutet werden, daß diese Selektivität schon in der Zellhülle begründet ist und um diese Hypothese zu prüfen, muß entweder der im Zellinneren ablaufende Metabolismus unterdrückt oder die isolierte Zellhülle untersucht werden.

Wir entschlossen uns letzteren Weg zu beschreiben. Dazu war es nötig, ein Verfahren auszuarbeiten, das erlaubt, diese Struktur reproduzierbar zu isolieren. Dabei fallen mikroskopisch gleiche Strukturen mit identischen biochemischen Eigenschaften an. Die ersten Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im folgenden beschrieben.

Anzucht der Chlorellen und Isolierung der Hüllen: Eine Synchronkultur (d. h. alle Zellen einer Kultur sind etwa gleich alt) wurde folgendermaßen erhalten: Das anorganische Nährmedium nach Kuhl *et al.*<sup>4</sup> wird mit *Chlorella fusca*<sup>5</sup> beimpft. Dieser Ansatz wird in einem Thermostaten (30 °C) mit Luft (der 1,5%  $CO_2$  beigemischt sind) begast und dem Licht-Dunkel-Wechsel von 14:10 Stunden ausgesetzt. Belichtet wird mit Leuchtstoffröhren derart, daß im Kulturmedium mit  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml 20 klx zu messen sind. Nach 3 Tagen ist die Suspension auf eine Konzentration von 2 bis  $3 \cdot 10^7$  Zellen/ml angewachsen und vollsynchron.

Zur Isolierung der Zellhüllen werden sofort nach der letzten Dunkelphase (junge Zellen) 20 ml mit  $2,5 \cdot 10^7$  Zellen/ml in den 50-ml-Becher einer Schüttelapparatur<sup>6</sup> gegeben, gefolgt von 50 ml Glasperlen ( $\phi$  0,3 mm). 60 sec lang wird höchsttourig geschüttelt. Dabei tritt praktisch keine Erwärmung des Schüttelgutes auf. Der Becherinhalt wird in eine Glasfilternutsche (Porengröße 1) gegeben und abgesaugt. Dann wird 2mal mit je 10 ml Nährmedium nachgespült. Im Filtrat liegen unter diesen Bedingungen von den eingesetzten Zellen rund 60% als optisch leere Hüllen vor und etwa 30% erscheinen unverändert. Zellen und Hüllen lassen sich im Phasenkontrast-Mikroskop gut unterscheiden und sind in einer der üblichen Erythrozyten-Zählkammern leicht zu zählen.

10 ml des Filtrats werden in ein 50-ml-Zentrifugenglas gebracht und mit folgenden Saccharose-Lösungen unterschichtet: 5 ml 0,5 M, 5 ml 0,6 M, 10 ml 0,75 M und 5 ml 0,9 M. Daraufhin wird 10 min lang bei etwa  $600 \times g$  zentrifugiert. Die 0,5 und 0,6 M Saccharose-Schichten sind von den dort konzentrierten Hüllen leicht milchig-weiß getrübt und enthalten rund 80% der für die Gradientenzentrifugation eingesetzten Zellhüllen. Die Schichten werden entnommen, mit Nährmedium verdünnt (1 Teil Saccharoselösung : 2 Teile Nährmedium) und 25 min lang bei etwa  $600 \times g$  zentrifugiert. Das Sediment wird mit Nährmedium aufgenommen. Ein typisches

Requests for reprints should be sent to Dr. W. Hülsen, Kernforschungszentrum Karlsruhe, Schule für Kerntechnik, D-7500 Karlsruhe, Postfach 3640.



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.



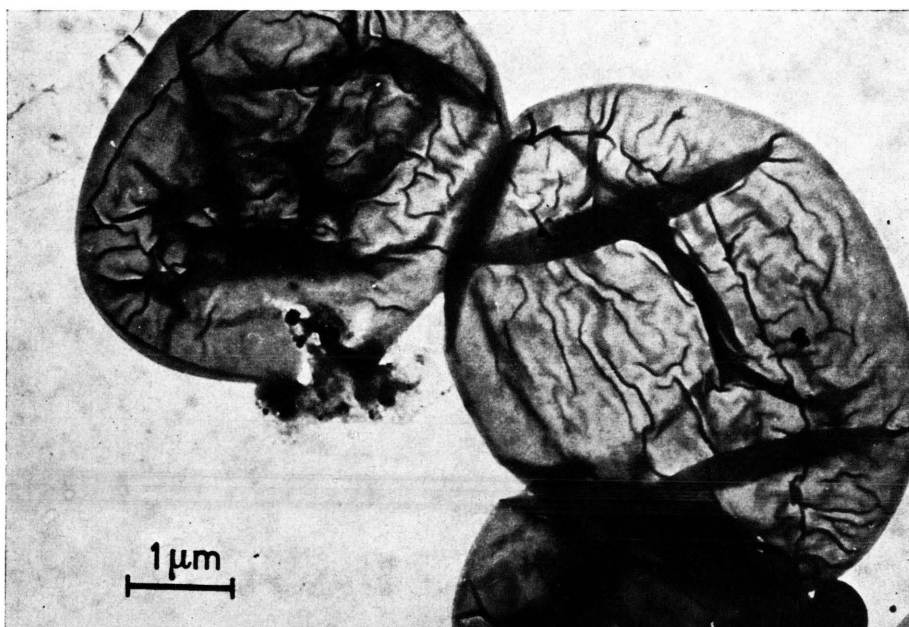


Abb. 1. Zellhülle von *Chlorella fusca*.  
(Näheres siehe Text.)

elektronenmikroskopisches Bild so erhaltener Zellhüllen zeigt Abb. 1 \*. Mit diesen Zellhüllen sind folgende Untersuchungen gemacht worden:

**Dichte-Bestimmung:** Ein CsCl-Gradient mit dem Dichte-Bereich  $\rho = 1,300 - 1,517$  wird mit 1 ml Hüllensuspension überschichtet und bei 4 °C 24 Stunden lang mit 24000 Upm im Rotor SW 27 der Ultrazentrifuge Spinco L 2/65 B zentrifugiert. Aus dem Zentrifugenröhrchen werden 11 Fraktionen entnommen und nach Ifft *et al.*<sup>7</sup> ihre Dichte bestimmt. Die Dichte der 2 Fraktionen, die die Zellhüllen enthielten, betrug im Mittel 1,42. In diesen Fraktionen ist kein Chlorophyll nachzuweisen (keine Extinktionen bei 665 und 650 nm).

**Fettsäuremuster:** Die Zellhüllen werden mit Chloroform – Methanol (2:1) extrahiert, der Lipidextrakt verseift, methyliert und im Gaschromatographen aufgetrennt. Dabei ergaben sich interessante Unterschiede im Bereich der C<sub>16</sub>- und C<sub>18</sub>-Fettsäuren. Der prozentuale Anteil von C<sub>16</sub>- und C<sub>18,3</sub>-Fettsäuren in den Zellhüllen ist ganz ähnlich dem von intakten Zellen. Dagegen ist der Anteil von C<sub>18</sub>-Fettsäuren in den intakten Zellen erheblich größer als in den Hüllen; bei letzteren überwiegen C<sub>18,1</sub>- und C<sub>18,2</sub>-Fettsäuren (Abb. 2).

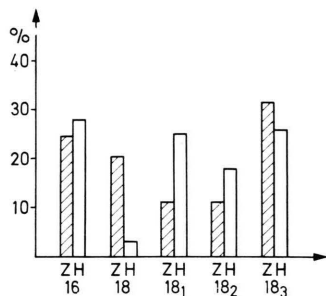


Abb. 2. Prozentualer Anteil einiger Fettsäuren. Z = intakte Zellen; H = Zellhüllen; die Zahlen der Abszisse bedeuten Kettenlängen und, als Index, Anzahl der Doppelbindungen;  $C_{16} + C_{18} + C_{18,1} + C_{18,2} + C_{18,3} = 100\%$ .

**Hexose-Aufnahme:** Einer Hüllensuspension ( $8,5 \cdot 10^6$  Hüllen/ml Nährmedium) werden 500 nmol [U-<sup>14</sup>C] Glucose/ml angeboten. Nach 30 min Inkubation bei 30 °C werden die Zellhüllen durch Filtration über einem Membranfilter vom Medium getrennt, gewaschen und ihre Radioaktivität gemessen (Probenvorbereitung nach Kalberer *et al.*<sup>8</sup>). Es zeigt sich, daß im Mittel 0,2% des vorgelegten <sup>14</sup>C in den Hüllen wiedergefunden wird. (Wenn die Hüllensuspension vor der Inkubation 1 min lang auf 100 °C erhitzt wurde, findet sich nie mehr als 0,02% der vorgelegten Radioaktivität in den Hüllen.)

\* Abb. 1 s. Tafel auf Seite 684 b.

**Glucoseaustausch:**  $10^7$  Zellhüllen, die 0,2% der angebotenen markierten Glucose aufgenommen hatten, werden abzentrifugiert, dann in Nährmedium aufgenommen, das 500 nmol unmarkierter Glucose enthält, und 30 min lang bei 30 °C inkubiert. Die Zellhüllen enthalten nach Aufarbeitung<sup>8</sup> noch 0,04% der ursprünglich vorgelegten <sup>14</sup>C-Aktivität.

Zur Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der Glucose-Aufnahme wurden neben der 30-minütigen Inkubation bei 30 °C noch Ansätze bei 4, 20, 25, 35 und 45 °C untersucht. Es war ein deutliches Maximum festzustellen (Abb. 3).

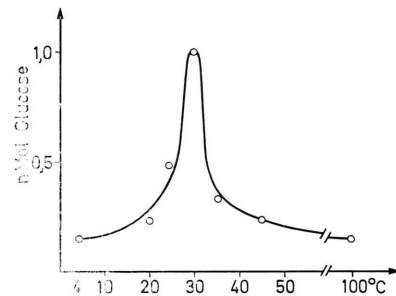


Abb. 3. Temperaturabhängigkeit der Glucoseaufnahme von Zellhüllen. Näheres siehe Text.

Die Selektivität der Hexose-Aufnahme wird durch 3 Stunden Inkubation bei 30 °C deutlich. Dabei ergibt sich, daß  $10^7$  Hüllen von den angebotenen 500 nmol Glucose, Mannose oder Galactose 1,5 nmol Glucose, bzw. 1,32 nmol Mannose, bzw. 0,3 nmol Galactose fixieren, wenn man die gefundene <sup>14</sup>C-Aktivität auf den entsprechenden Zucker umrechnet.

Die Resultate einer Glucose-Aufnahme in Abhängigkeit von der Zeit ergeben — graphisch dargestellt — eine Kurve, die einem Grenzwert zuzustreben scheint (Abb. 4).

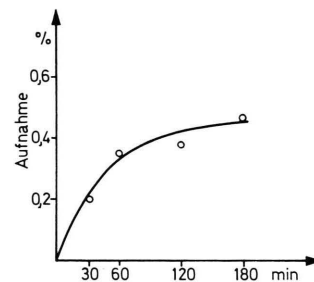


Abb. 4. Glucose-Aufnahme von Zellhüllen (in %) in Abhängigkeit von der Zeit.

Die Ergebnisse dieser ersten Versuche zur Charakterisierung von *Chlorella*-Hüllen und zur Prüfung der Hypothese, nach der schon in der Hülle eine Selektivität für Hexosen zu erwarten ist, bestärken

uns in folgenden Annahmen. Erstens: die morphologische Struktur „Hülle“ scheint — auf Grund der ermittelten Dichte von 1,42 — neben Proteinen, Lipiden und Hemicellulosen (die Northcote<sup>1</sup> nachweisen konnte) auch Nukleinsäure-haltige Anteile aufzuweisen, denn die mittlere Dichte von Proteinen liegt bei 1,34 und das spez. Gewicht von Lipiden und Hemicellulosen ist noch geringer. Zweitens: die Zellhülle hat offensichtlich eine Art enzymatischer Aktivität, wofür das Temperaturmaximum und die Selektivität sprechen. Letztere ist analog der bei in-

takten Zellen: Glucose und Mannose sind gegenüber Galactose bevorzugt (was für unsere Hypothese spricht). Interessant ist, daß in der Zellhülle anscheinend zwei Arten der <sup>14</sup>C-Fixierung existieren. 80% der Aktivität können durch hohe Konzentration von Glucose freigesetzt werden, was auf adsorptive Bindung schließen läßt; 20% dagegen sind irreversibel fixiert. Dieses Ergebnis läßt sich auch mit der Vorstellung eines Carriers vereinbaren.

Dr. G. Heinrich, Staatsinstitut für Allgemeine Botanik, Hamburg, danken wir für die EM-Aufnahme.

<sup>1</sup> D. H. Northcote, K. J. Goulding u. R. W. Horne, Biochem. J. **70**, 391 [1958].

<sup>2</sup> W. Hülsen u. U. Prenzel, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **350**, 1169 [1969].

<sup>3</sup> W. Hülsen u. U. Prenzel, Z. Naturforsch. **22b**, 683 [1967].

<sup>4</sup> A. Kuhl u. H. Lorenzen, Methods in Cell Physiology, Bd. 1, p. 159, Prescott, London 1964.

<sup>5</sup> Stamm 211-8b der Algensammlung des Pflanzenphysiolog. Inst. d. Universität Göttingen.

<sup>6</sup> Vibrogen Zellmühle, E. Bühler, Tübingen.

<sup>7</sup> I. B. Ifft, D. H. Voet u. J. Vinograd, J. Phys. Chem. **65**, 1138 [1961].

<sup>8</sup> F. Kalberer u. J. Rutschmann, Helv. Chim. Acta **44**, 1956 [1961].