

Isolierung von PS II-Partikeln mit *in vivo* Eigenschaften aus *Euglena gracilis*, Stamm Z

Isolation of PS II-Particles with *in vivo* Characteristics from *Euglena gracilis*, Stamm Z

F. Schuler, P. Brandt und W. Wießner

Abteilung für Experimentelle Phykologie des Pflanzenphysiologischen Institutes der Universität Göttingen, Untere Karspüle 2, D-3400 Göttingen

Z. Naturforsch. **37c**, 256–259 (1982); eingegangen am 21. Dezember 1981

Chlorophyll-Protein-Complex, *Euglena gracilis*, Photosystem II Particle

An improved method for isolation of (photosystem II)-particles from *Euglena gracilis*, strain Z was established. PS II-particles isolated by ultrasonic treatment and following differential centrifugation show fluorescence emission and absorption spectra identical with *in vivo* properties of *Euglena gracilis*. These PS II-particles have only PS II-activity and contain CP a, the typical chlorophyll-protein-complex of PS II. No contamination of PS I-components are detectable.

Einleitung

Zur Charakterisierung des Photosyntheseapparates Höherer Pflanzen oder Algen wurden bislang entweder Organismen mit einem auf den Photosyntheseapparat wirkenden genetischen Defekt mit den „Wild-Typen“ verglichen [1] oder photosynthetisch aktive Partikel mit Hilfe von Detergentien wie Digitonin, SDS oder Triton X-100 [2, 3] isoliert. Bei *Euglena gracilis*, Stamm Z weichen die Eigenschaften dieser Partikel aber deutlich von denen intakter Euglenen oder isolierter Euglena-Chloroplasten ab [4]. Offensichtlich zerlegt die Einwirkung der Detergentien die Thylakoidmembran nicht nur in verschieden große Bruchstücke zwischen 80 und 200 Å, sondern verändert drastisch zusätzlich ihre innere Organisation, wie durch Messungen der Fluoreszenzemission eindeutig belegt wird [4]. Deswegen stellen wir eine neue Methode vor, die eine Isolierung eines PS II-Partikels aus *Euglena gracilis* ermöglicht, dessen Eigenschaften weitgehend denen von *Euglena gracilis in vivo* entsprechen.

Material und Methoden

Euglena gracilis, Stamm Z (Sammlung von Algenkulturen, Pflanzenphysiologisches Institut der Uni-

Abkürzungen: CP a, Chlorophyll-Protein-Komplex a; CP I, Chlorophyll-Protein-Komplex I; DCPIP, Dichlorophenolindophenol; DPC, 1.5-Diphenylcarbazid; LHCP, Light-harvesting-chlorophyll-protein-Komplex; PAGE, Polyacrylamidgelelektrophorese; PAGIF, Polyacrylamidgelsisoelektrofokussierung; PS-I, Photosystem I; PS-II, Photosystem II; SDS, Natriumdodecylsulfat.

Sonderdruckanforderungen an F. Schuler.

0341-0382/82/0300-0256 \$ 01.30/0

versität Göttingen) wurde autotroph [5] in einem Licht-Dunkel-Wechsel von 14 Stunden Licht und 10 Stunden Dunkel bei 27 °C und 10 000 Lux kultiviert. Nach Isolation intakter Chloroplasten [6] wurden diese in einer 15 mM NaCl-Lösung [7] aufgenommen und mit Ultraschall behandelt (40 sec, 8 D.C. ampere; Branson Sonic Power, Branson Instruments, Danburg, Connecticut). Das entstandene Chloroplastenhomogenat wurde durch eine differentielle Zentrifugation aufgetrennt: (a) 5 min bei 1000 × g, Pellet 1, (b) 30 min bei 10 000 × g, Pellet 10, (c) 30 min bei 35 000 × g, Pellet 35, (d) 90 min bei 140 000 × g, Pellet 140. Das Pellet 1 enthielt ein Gemisch verschieden großer Chloroplastenbruchstücke und wurde daher verworfen. Die übrigen Pellets wurden in Phosphatpuffer (50 mM, pH 6,5) aufgenommen.

Die Proteinspektren der Pellets 10, 35 und 140 wurden mittels SDS-PAGE (15-prozentig) nach Laemmli [8, 9] erstellt. Die Identifizierung ihrer Chlorophyll-Proteide erfolgte durch PAGIF [10] und anschließender Reelektrophorese in Plattengelen [9]. Die Leistung des photosynthetischen Elektronentransportes der Pellets 10, 35 und 140 wurde als DCPIP-Reduktion mit oder ohne den künstlichen e⁻-Donator DPC [11, 12] bzw. als Methylviologenreduktion bestimmt [6]. Der pH-Wert der Versuchsansätze lag im Optimumsbereich für ultraschallaufgebrochene Chloroplasten bei pH 6,5 [21].

Tieftemperatur-Fluoreszenzemissionsspektren wurden mit Hilfe der Meßapparatur in Anlehnung an Harnischfeger [13] aufgenommen. Zum Vergleich mit Ultraschallpartikeln wurden ebenfalls die Fluoreszenzemissionsspektren von Chloroplasten aufgenommen, die mit Triton X-100 aufgeschlossen wor-



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.

den waren (30 min Tritonbehandlung, Endkonzentration 0,5%).

Ergebnisse und Diskussion

Das Fluoreszenzemissionsspektrum intakter *Euglena gracilis* weist deutliche Maxima bei 690 nm und 730 nm auf (Abb. 1). Der kurzwellige Fluoreszenzemissionspeak wird dem Photosystem II zusammen mit dem light-harvesting-system, der langwellige dem Photosystem I zugeschrieben [14–16]. Im Vergleich dazu ist das Fluoreszenzemissionsspektrum der Triton-behandelten Chloroplasten aus *Euglena gracilis* drastisch verändert (Abb. 1): die Intensität der langwelligen Emission bei 730 nm ist stark reduziert und verschwindet bei längerer Einwirkungsdauer völlig. Das Emissionsmaximum bei 690 nm zeigt einen deutlichen blue-shift nach 681 nm [15–17]. Das Reaktionszentrum des Photosystems I, der Chlorophyll-Protein-Komplex CPI, ist jedoch im durch SDS-PAGE ermittelten Proteinspektrum dieser Triton-behandelten Chloroplasten vorhanden, denn dieses Chlorophyll-Proteid ist in der gelelektrophoretischen Auftrennung eindeutig als grüne Chlorophyll-Protein-Bande zu sehen. Offenbar erfährt die Thylakoidmembran durch die

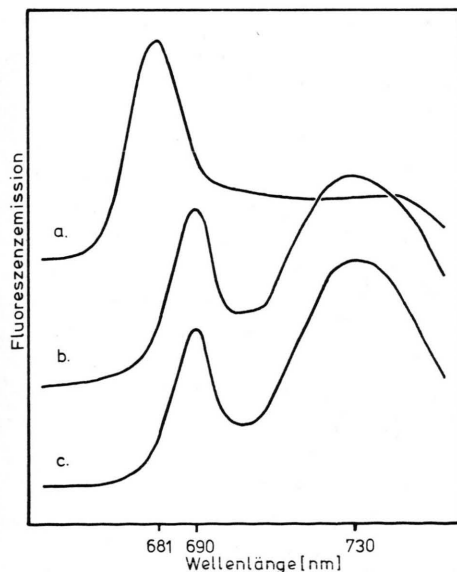


Abb. 1. Tieftemperatur-Fluoreszenzemissionsspektren von a) tritonbehandelten Chloroplasten, b) ultraschallbehandelten Chloroplasten und c) intakter *Euglena gracilis*.

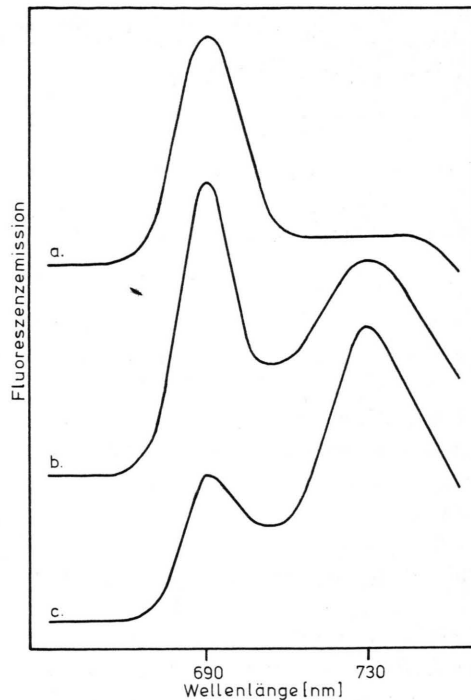


Abb. 2. Tieftemperatur-Fluoreszenzemissionsspektren von Ultraschallpartikeln nach differentieller Zentrifugation. a) Pellet 140, b) Pellet 35 und c) Pellet 10.

Tritonbehandlung eine Umorganisation, die das gewöhnliche *in vivo* Fluoreszenzemissionsspektrum nicht mehr ermöglicht. Das Fluoreszenzemissionsspektrum der mit Ultraschall behandelten Chloroplasten von *Euglena gracilis* hingegen entspricht dem der intakten Euglenen (Abb. 1). Die Behandlung mit Ultraschall bewirkt also im Gegensatz zur Tritoneinwirkung ein Zerlegen in Partikel ohne intrathylakoidale Umorganisation. Diese Präparation gestattet daher die Isolierung eines Photosystem II-Partikels aus dem Thylakoidsystem von *Euglena*-Chloroplasten und seine Charakterisierung sowohl durch Messung der photochemischen Aktivität mittels DCPIP-Reduktion als auch durch Fluoreszenzemissionsspektroskopie bei Tieftemperatur. Etwaig noch vorhandene PS I-Anteile lassen sich durch die Methylviologen-Reduktion bzw. durch das typische Fluoreszenzemissionsmaximum bei 730 nm nachweisen.

Die durch Ultraschallbehandlung gewonnenen Thylakoidpartikel wurden durch differentielle Zentrifugation weiterfraktioniert und ihre Eigenschaften bestimmt (Abb. 2). Die Emissionsmaxima der Pellets 10 und 35 liegen bei 690 und 730 nm, wobei der

Tab. I. Photosyntheseaktivität und Chlorophyll-Protein-Komplex-Gehalt der durch Ultraschallbehandlung aus *Euglena*-Chloroplasten isolierten Partikel Pellet 10, Pellet 35 und Pellet 140.

| | Aktivität von | | Chlorophyll-Protein-Komplexe | | |
|-------|---------------|-------|------------------------------|------|------|
| | PS I | PS II | CP I | CP a | LHCP |
| P 10 | + | + | + | + | + |
| P 35 | + | + | +(−) | + | + |
| P 140 | − | + | − | | + |

Anteil der langwelligen Fluoreszenzemission bei Pellet 35 niedriger ist als bei Pellet 10. Dem Pellet 140 – den kleinsten Partikeln – fehlt diese langwellige, für PS I typische Fluoreszenzemission völlig (Abb. 2). Damit handelt es sich bei Pellet 140 um reine PS II-Partikel ohne PS I-Reste. Dies bestätigen auch die DCPIP- bzw. Methylviologenreduktionsraten von Pellet 10, Pellet 35 und Pellet 140. Pellet 10 und Pellet 80 zeigen sowohl PS I- als auch PS II-Aktivität (Tab. I), Pellet 140 jedoch nur noch PS II-Aktivität.

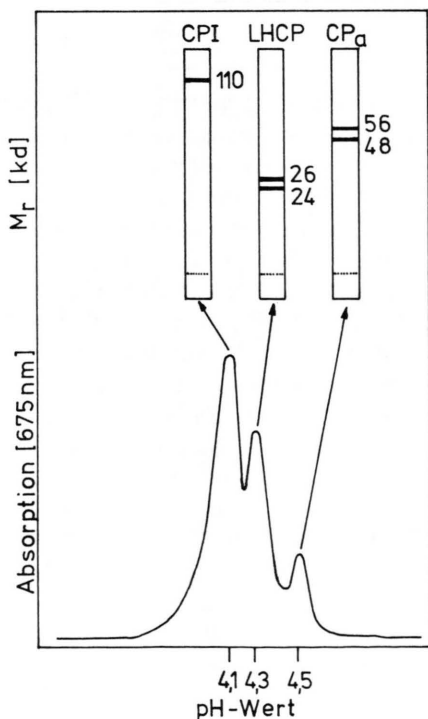


Abb. 3. PAGIF der tritonbehandelten Chloroplasten von *Euglena gracilis*, Stamm Z und anschließende Reelektrophorese der grünen PAGIF-Banden.

Die DCPIP-Reduktionsrate liegt bei diesen Partikeln zwischen 70 und 150 mol DCPIP red. · mg Chl⁻¹ · h⁻¹. Diese Rate liegt wesentlich über der, die von PS II-Präparationen aus *Euglena*-Chloroplasten mit Hilfe des Detergens Digitonin bekannt ist [6]. Da die Zugabe von DPC [11, 12] die DCPIP-Reduktionsrate von Pellet 140 nicht wesentlich erhöht, sind die Reaktionszentren des Photosystems II noch mit dem wasserspaltenden Apparat sowie dem primären e⁻-Donator des Photosystems II gekoppelt. Demnach bleibt bei der hier gewählten Ultraschallbehandlung und Isolierung von PS II-Partikeln die funktionelle Einheit des Photosystems II erhalten.

Eine weitere Charakterisierung von Pellet 10, 35 und 140 erfolgte durch Bestimmung ihres Gehaltes an den Chlorophyll-Protein Komplexen CP I, CP a und LHCP bzw. ihrer Apoproteine. Bei PAGIF von Triton-behandelten *Euglena*-Chloroplasten lassen sich drei grüne Banden (Abb. 3) mit unterschiedlichen Absorptionsspektren (Abb. 4) voneinander

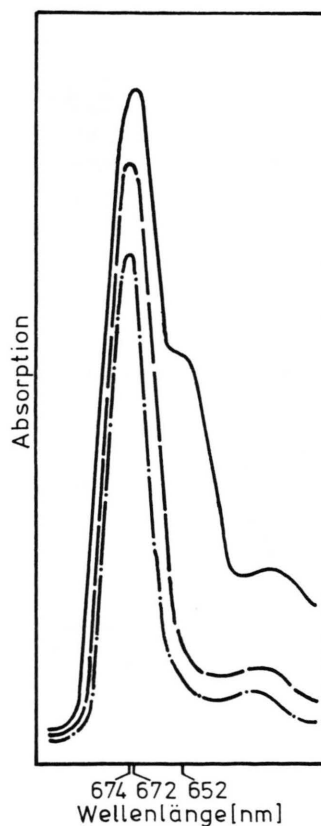


Abb. 4. Absorptionsspektren der Chlorophyll-Protein-Komplexe LHCP (—), CP I (---) und CP a (-·-·-) von *Euglena gracilis*, Stamm Z.

trennen. Neben den bereits länger bekannten Komplexen CP I und LHCP [9, 20] trat noch das erst kürzlich beschriebene CP a auf [20]. Die Reelektrophorese (Abb. 3) dieses Chlorophyll-Proteids ergab zwei Apoproteine mit dem Molekulargewicht von 56 und 48 Kd.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Partikelproteine ergab sowohl bei den Pellet 10-Partikeln als auch bei den Pellet 35-Partikeln das Vorhandensein von CP I (Tab. I). Neben CP I, dem Reaktionszentrum des Photosystems I, waren in geringerer Menge (6%) auch die Apoproteine des CP a sowie das LHCP (15%) vertreten. In den Pellet 140-Parti-

keln ist das CP I nicht mehr nachweisbar, dagegen ist der Anteil des CP a auf bis zu 15% gestiegen. Damit ist dieses Polypeptid in den Photosystem II-Partikeln im Vergleich mit Thylakoiden aus *Euglena gracilis* um das 2 bis 3-fache angereichert.

Die hier aus *Euglena gracilis* isolierten PS II-Partikel zeigen sämtliche Charakteristika der *in vivo* Eigenschaften vom Photosystem II intakter Euglenen.

Dank

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft wird für finanzielle Förderung gedankt (Br 652/3; 652/3z).

- [1] J. Maroc u. J. Garnier, *Biochim. Biophys. Acta* **637**, 473–480 (1981).
- [2] J. M. Anderson u. N. K. Boardman, *Biochim. Biophys. Acta* **112**, 403–421 (1966).
- [3] B. Ke, K. Sugahara u. E. R. Shaw, *Biochim. Biophys. Acta* **418**, 12–25 (1975).
- [4] J. S. Brown, *Biochim. Biophys. Acta* **591**, 9–21 (1980).
- [5] W. Wiessner, *Planta* **79**, 92–98 (1969).
- [6] P. Brandt, *Z. Pflanzenphysiol.* **103**, 65–74 (1981).
- [7] G. Jacobi, *Z. Pflanzenphysiol.* **57**, 255 (1967).
- [8] U. K. Laemmli, *Nature* **227**, 680–685 (1970).
- [9] P. Brandt, *Z. Pflanzenphysiol.* **100**, 95–105 (1980).
- [10] D. Siefermann-Harms u. H. Ninnemann, *FEBS Lett.* **104**, 71–77 (1979).
- [11] L. P. Vernon u. E. R. Shaw, *Plant Physiol.* **44**, 1645–1649 (1969).
- [12] L. P. Vernon u. E. R. Shaw, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 878–884 (1969).
- [13] G. Harnischfeger, *Adv. Bot. Res.* **5**, 1–53 (1978).
- [14] W. L. Butler, *Arch. Biochem. Biophys.* **93**, 413–422 (1961).
- [15] N. K. Boardman, S. W. Thorne u. J. M. Anderson, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **56**, 586–593 (1966).
- [16] J. C. Goedheer, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **23**, 87–112 (1972).
- [17] K. Satoh u. W. L. Butler, *Plant Physiol.* **61**, 373–379 (1978).
- [18] J. S. Brown u. S. Schoch, *Biochim. Biophys. Acta* **636**, 201–209 (1981).
- [19] M. D. Il'Ina, E. A. Kotova u. A. Yu. Borisov, *Biochim. Biophys. Acta* **636**, 193–200 (1981).
- [20] W. Ortiz u. E. Stutz, *FEBS Letters* **116**, 298–302 (1980).
- [21] G. Jacobi, *Meth. Enzymol.* **23**, 289–296 (1971).