

## Bildung der Thylakoidproteine während der Ergrünung einer vergilbten Mutante von *Chlamydomonas reinhardi* \*

A. Boschetti \*\*, J. C. Schaffner und S. Leuenberger  
Biochemisches Institut der Universität Bern

### Summary

The thylakoid proteins of green, of bleached, and of regreening cells from the chromosomal, streptomycin-resistant mutant  $sr_3$  of *Chlamydomonas reinhardi* have been analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The prominent protein band I of thylakoids from green cells (m.w. approx. 67000) is characteristic for photosystem I-particles, whereas the major bands IIa, IIb and IIc (m.w. approx. 32000, 28000, 23000, respectively) are accumulated in photosystem II preparations. Even after purification by flotation in sucrose, several minor bands of glycoproteins can be detected in green thylakoids. In streptomycin-bleached cells the characteristic pattern of thylakoid proteins as well as the ribulose-1,5-diphosphate carboxylase are absent. During light-induced greening of such cells under conditions of suppressed cell division, the protein bands I and IIa, as well as chlorophyll and ribulose-1,5-diphosphate carboxylase became detectable after a lag of 24 h. The synthesis of the protein bands IIb and IIc, which are reported to be related to thylakoid stacking, starts even later, but continues longer.

Das Studium der Thylakoidbildung ist nicht nur für das Verständnis der Chloroplastenbiogenese, sondern allgemein als Modellfall für die Synthese energie-konservierender Membranen bedeutsam. Während die Lipide dieser, im Chloroplasten vorkommenden, grünen, photosynthetisierenden Thylakoidmembranen ziemlich bekannt sind [1,2,3], kennt man weder Art noch Anzahl der Proteinkomponenten genau. Noch weniger bekannt ist die Reihenfolge, in welcher die verschiedenen Proteine und Lipide in die Membran eingefügt werden.

Die Veränderung der Membranzusammensetzung im Verlaufe der Thylakoidsynthese kann experimentell während der Ergrünung vergilbter Zellen studiert werden. Bei der Belichtung etiologischer, höherer Pflanzen wandelt sich der Etioplast innerhalb 48 h [4] in den Chloroplasten um, wobei die ersten Thylakoide aus den im Prolamellarkörper vorhandenen, präformierten Proteinen und Lipiden neu entstehen [5]. Von der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardi* kennt man zwei Klassen von Mutanten, die unter bestimmten Kulturbedingungen ebenfalls gelbe Zellen bilden, deren Plastiden aber keinen Prolamellarkörper mit präformiertem Membranmaterial besitzen. Bei der Ergrünung dieser Zellen muss also Membranmaterial neu synthetisiert werden. Hauptvertreter dieser Mutantenklassen sind einerseits die Mutante y-1 [6], welche im Dunkeln vergilbt, andererseits die chromosomale streptomycin-resistente Mutante  $sr_3$  [7], die im Dunkeln in Gegenwart subletaler Dosen Streptomycin weder Chlorophyll noch Thylakoide bildet.

In dieser Arbeit haben wir während der Ergrünung von vergilbten  $sr_3$ -Zellen mittels SDS-Gelelektrophorese die Veränderung der Proteinzusammensetzung in den Thylakoiden verfolgt. Als Vergleich mussten zuvor Anzahl und Molekulargewichte der elektrophoretisch auftrennbaren Thylakoidproteine grüner Zellen bestimmt werden.

### Experimentelles

Der Stamm *Chlamydomonas reinhardi*  $sr_3$  sowie dessen Kultivierung, Vergilbung und Wiederergrünung wurden früher beschrieben [7,8,9].

Zur Isolierung der Thylakoide wurden die Zellen im Homogenisierungspuffer (25 mM Tris/HCl pH 7,6; 25 mM KCl; 25 mM Mg-Acetat; 1,25 mM K-EDTA; 5 mM  $\beta$ -Mercaptoäthanol) gewaschen, bei einer Zelldichte von  $3 \times 10^8$  Z/ml und bei 10000 psi in der Ribipresse (Sorvall) aufgeschlossen und die Rohthylakoide während 20 min bei 38000 g und bei 4°C abzentrifugiert. Für die Reinigung der Rohthylakoide durch Flotieren wurde das Sediment in obigem Puffer, der zusätzlich 2,6 M Saccharose enthielt, aufgenommen und in SW 27 Röhrchen (Beckman Ultrazentrifuge) mit je 10 ml dieses Puffers überschichtet, enthaltend 2,2 M, 1,87 M und 0 M Saccharose. Nach 90 min Zentrifugation bei 26000 rpm und 4°C wurden die grünen Zonen mit der Spritze abgesogen und nach Verdünnen sedimentiert.

Die Isolierung von Photosystem-I- und Photosystem-II-Partikel geschah im wesentlichen nach Picaud [10]. Zur Solubilisierung der Membranproteine wurden die Thylakoidpräparate über Nacht dialysiert (20 mM Tris/HCl pH 7,6; 14 mM  $\beta$ -Mercaptoäthanol), lyophilisiert, mit 90% Aceton 2- bis 3 mal entfettet und dann in 20 mM Tris/HCl pH 7,6, 14 mM  $\beta$ -Mercaptoäthanol und 1% SDS gelöst.

Die Proteine wurden zum Teil nach Hooper [11], zum Teil nach der viel rascheren, hier beschriebenen Methode elektrophoretisch aufgetrennt: Die Polyacrylamidgelle von 12 cm Länge und 0,6 cm Durchmesser enthielten 8% Acrylamid; 0,21% N,N'-Methylen-Bisacrylamid; 0,05 M Tris; 0,05 M Bicin; 0,2% SDS; 0,85  $\mu$ l/ml Tetramethyl-Äthyldiamin und 0,5 mg/ml Ammoniumpersulfat (pH der Lösung: 8,3). Aufgetragen wurden etwa 120  $\mu$ g Protein in höchstens 100  $\mu$ l Volumen zusammen mit Bromphenolblau als Frontmarker. Der Elektrophoresepuffer bestand aus 0,05 M Tris, 0,05 M Bicin und 0,1% SDS. Die Stromstärke betrug 5 mA/Gel. Die Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung und die PAS-Färbung der Gele erfolgten gemäss Maurer [12]. Die Molekulargewichtsskalen der Figu-

\* Eingegangen am 23. Dezember 1975

\*\* Dr. A. Boschetti, Institut für Biochemie der Universität Bern, Länggassstrasse 7, CH-3012 Bern

ren wurden durch Vergleich mit coelektrophoretisierten Markerproteinen berechnet (Lysozym, Myoglobin, Chymotrypsinogen A, Ovalbumin, Rinderserumalbumin).

### Ergebnisse und Diskussion

#### a) Thylakoidproteine aus grünen Zellen

Aus *Chlamydomonas reinhardi* kann man bis heute die Chloroplasten nicht rein und intakt isolieren. Will man Thylakoidmembranen gewinnen, muss man daher aus dem gesamten Zellhomogenat die an Chlorophyll angereicherten Membranfraktionen isolieren. Durch fraktionierte Zentrifugation erhält man in einem ersten Reinigungsschritt die Rohthylakoide, deren Proteine nach SDS-Elektrophorese und Anfärbung der Proteine mit Coomassie-Blau das in Abb. 1 wiedergegebene Densitogramm ergeben. Bei Anwendung der für Glykoverbindungen spezifischen PAS-Färbung zeigt sich, dass besonders im oberen Teil des Gels 8 bis 9 Glykoproteinbanden auftreten. Für diese gilt die Molekulargewichtsskala nicht, da Glykoproteine mit SDS anders komplexieren als reine Proteine. Im unteren Teil des Geles, bei Molekulargewichten von weniger als 20000, sind die drei Proteinbanden mittlerer Intensität je nach Aufarbeitung oft durch Glyko- und auch Lipo-Protein-komponenten maskiert, welche wahrscheinlich Abbau-produkte darstellen.

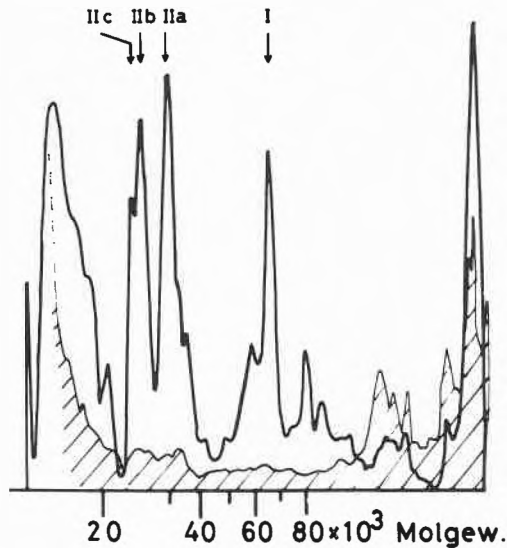


Abb. 1: Elektropherogramm der Proteine aus Rohthylakoiden von phototroph kultivierten, grünen Zellen von *Chlamydomonas reinhardi sr<sub>3</sub>*. Elektrophoresebedingungen in SDS-Gelen nach Hooper [11]. Nicht schraffiert: Färbung mit Coomassie Brilliant Blue; schraffiert: PAS-Färbung der Glykoproteine

Die weitere Reinigung der Rohthylakoide durch Flotation in Saccharoselösungen führt zur Entfernung einer ganzen Reihe schwacher Proteinbanden im oberen Gelteil sowie zur mengenmässigen Verminderung der Glykoproteine (Abb. 2, unten).

Durch Tritonbehandlung können aus den flotierten Thylakoidmembranen oder auch aus den Rohthylakoiden Fraktionen gewonnen werden, die an Photosystem-I- bzw. Photosystem-II-Partikeln angereichert sind. Gleich wie Steinback und Goodenough [13] finden wir in unseren Präparaten aus *Chlamydomonas reinhardi* für das Photosystem I ein Chlorophyll-a/b-Verhältnis von 1,85 bis 2,35, während bei Spinat ein solches von mehr als 4 beschrieben wird. Das Chlorophyll-a/b-Verhältnis des Photosystems II hingegen ist mit 1,5 bis 1,7 demjenigen aus Spinat ähnlich. Intakte Zellen von *Chlamydomonas reinhardi* weisen ein Verhältnis von etwa 2 auf.

Die Proteinanalyse unserer Photosystem-I- und Photosystem-II-Fractionen bestätigen die Befunde von Anderson und Levine (14): Im Photosystem I sind die Proteine der dominanten Bandengruppe I (Molekulargewicht 58000 bis 64000) angereichert, während im Photosystem II die charakteristischen Banden II a bis c (Molekulargewicht 23000 bis 34000) auftreten (Abb. 2: bei der Elektrophorese in Tris/Bicin werden die Banden IIb und IIc densitometrisch nicht mehr aufgelöst).

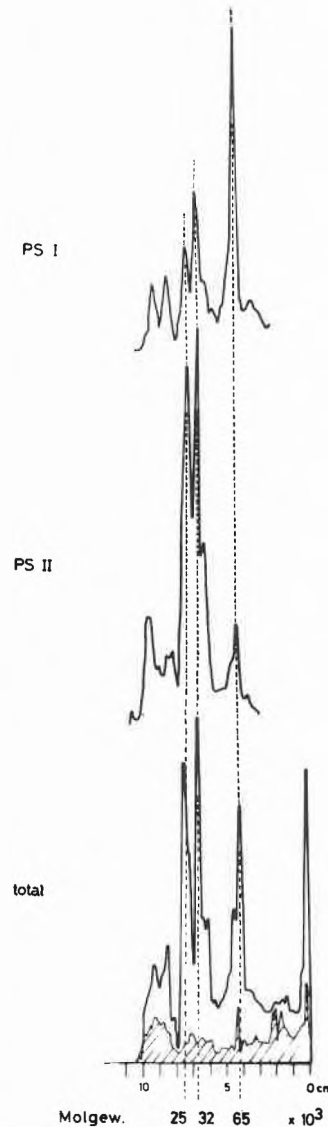


Abb. 2: Elektropherogramme der Proteine von flotierten Thylakoiden (total) sowie von daraus durch Triton-X-100-Behandlung isolierten Photosystem-I- und Photosystem-II-Fractionen. Die Thylakoide stammen aus phototroph kultivierten, grünen Zellen von *Chlamydomonas reinhardi sr<sub>3</sub>*. SDS-Gelelektrophorese in Tris/Bicin-Puffer. Nicht schraffiert: Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung; schraffiert: PAS-Färbung der Glykoproteine

Auch in Photosystem-I- und Photosystem-II-Fraktionen, welche aus flotierten Thylakoiden isoliert worden sind, findet man u. a. im Bereich der Hauptbanden noch geringe Mengen von Glykoproteinen.

Über Synthese und Funktion dieser Proteine ist recht wenig bekannt. Mindestens ein Protein der Bandengruppe I wird im Chloroplasten synthetisiert, während IIb und IIc im Cytoplasma gebildet werden [11,15]. Die Gruppe von Levine [14,16,17] zeigte zudem, dass die Banden IIb und IIc nicht an der Photosyntheseaktivität, sondern an der Stapelung der Thylakoide zu Grana beteiligt sind. Leitbündelscheiden-Zellen von Mais oder mutierte Zellen verschiedener Organismen, deren Chloroplasten keine Grana, wohl aber Photosystem-II-Aktivität aufweisen, enthalten keine Banden IIb und IIc.

*b) Entstehung der Thylakoidproteine während der Ergrünung von Streptomycin-vergilbten sr<sub>3</sub>-Zellen*

Streptomycin-vergilbte Zellen von *Chlamydomonas reinhardi* sr<sub>3</sub> enthalten praktisch keine Thylakoide, wohl aber die Plastidenhüllmembran und Stärke [8]. Bei der Wiederergrünung solcher Kulturen setzt nach einer lag-Phase von 24 h eine rasche Chlorophyllbildung ein (Abb.3). Die Carotinoidsynthese verläuft langsamer, während die Zellenzahl über mindestens 72 h konstant bleibt. Dies bedeutet, dass in unserem Ergrünungsmedium, das Stickstoff und Phosphor in limitierenden Mengen enthält, die Thylakoidstrukturen und das Chlorophyll unabhängig von der Zellteilung synthetisiert werden. Auch der Gehalt an Ribulose-1,5-Diphosphat-Carboxylase, einem löslichen, durch Strep-

tomyacin hemmbaren Chloroplastenzym, nimmt bei der Ergrünung zu, wie die Messung der Enzymaktivität [18] und die Elektrophorese der löslichen Proteine (unveröffentlicht) zeigten.

Um die Bildung der Thylakoidproteine zu verfolgen, wurden nach 0, 12, 24, 48 und 72 h Ergrünung die Rohthylakoide isoliert und deren Proteinzusammensetzung elektrophoretisch analysiert (Abb.4). Wie für die Chlorophyllsynthese findet man auch für die Bildung der typischen Thylakoidproteine eine lag-Phase von 24 h. Offenbar ist die Chlorophyllakkumulation von der Existenz gewisser Membranproteine abhängig. Bemerkenswerterweise entstehen aber nicht alle Thylakoid-Hauptproteine zur gleichen Zeit. Während die Banden I und IIa als erste auftauchen, treten die Banden IIb und IIc erst bei 48 h auf, überwachsen jedoch nach 72 h die zuerst aufgetretenen Banden.

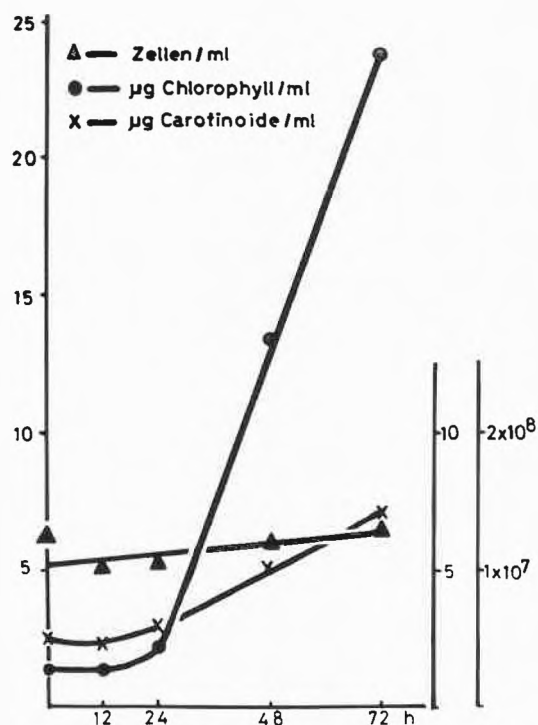


Abb. 3: Ergrünung Streptomycin-vergilbter Zellen von *Chlamydomonas reinhardi* sr<sub>3</sub>. Chlorophyll- und Carotinoid-Gehalt sind auf das Volumen der Zellsuspension bezogen

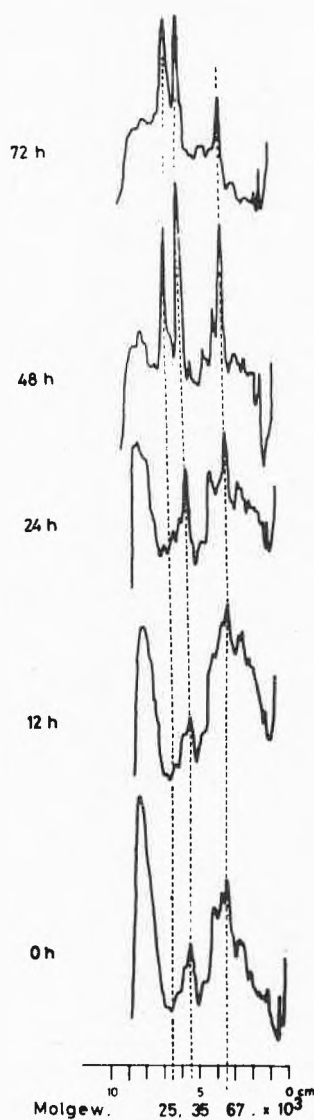


Abb. 4: Elektropherogramme der Proteine aus den Rohthylakoiden ergrünender Zellen von *Chlamydomonas reinhardi* sr<sub>3</sub>. Die Thylakoide wurden zu den angegebenen Zeiten nach Einsetzen der Belichtung isoliert. SDS-Gel-elektrophorese in Tris/Bicin-Puffer

Das bedeutet, dass die Thylakoidmembranen während der Biosynthese ihre Proteinzusammensetzung kontinuierlich ändern. Sie reifen sozusagen in einem mehrstufigen Vorgang bis zu ihrer Zusammensetzung in voll

ergrüntem Zustand. Dass dabei die für die Stapelung der Thylakoide verantwortlichen Proteine I**b** und I**c** später eingefügt werden, leuchtet ein, wirft aber gleichzeitig die Frage nach der Regulation dieser cytoplasmatisch synthetisierten Proteine auf. Die gleiche Sequenz der Bildung der Thylakoidmembranproteine haben Beck und Levine [19] ebenfalls bei *Chlamydomonas* mit einer ganz anderen Versuchsanordnung festgestellt: in Synchronkulturen von Wildtypzellen werden während der Lichtperiode zuerst die Proteine I und IIa gebildet. In der zweiten Hälfte der Lichtperiode überwiegt dann die Synthese von I**b** und I**c**.

Vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der Wissenschaften unterstützt. Frau E. Sauton danken wir bestens für die gewissenhafte Durchführung der Elektrophoresen.

#### Literaturverzeichnis

- 1 H. K. Lichtenthaler und R. B. Park: *Nature* 198 (1963) 1070–1072.
- 2 T. W. Goodwin: *Biochemistry of Chloroplasts*, Vol. I, Academic Press, London 1966, S. 91 ff.
- 3 W. Eichenberger: *Phytochemistry* 1975, im Druck.
- 4 P. Gregory und J. W. Bradbeer: *Biochem. J.* 148 (1975) 433–438.
- 5 K. W. Henning und J. E. Boynton: *J. Cell Sci.* 15 (1974) 31–55.
- 6 R. Sager und G. E. Palade: *Exper. Cell Res.* 7 (1954) 584.
- 7 A. Boschetti, E. C. Grob und C. Strasser: *Proceedings of the 2nd International Congress on Photosynthesis* (G. Forti, M. K. Avron und A. Melandri, eds.), W. Junk Publ., 1972, S. 2633–2642.
- 8 A. Boschetti und A. Walz: *Arch. Mikrobiol.* 89 (1973) 1–14.
- 9 W. Eichenberger und A. Boschetti: *FEBS Letters* 55 (1975) 117–119.
- 10 A. Picaud: *Biochem. Biophys. Acta* 275 (1972) 414–426.
- 11 J. K. Hooper: *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 4327–4334.
- 12 H. R. Maurer: *Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis*, 2nd edition, de Gruyter, Berlin 1971, S. 72–78.
- 13 K. E. Steinback und U. W. Goodenough: *Plant Physiol.* 55 (1975) 864–869.
- 14 J. M. Anderson und R. P. Levine: *Biochem. Biophys. Acta* 333 (1974) 378–387.
- 15 R. C. Jennings und G. Eytan: *Arch. Biochem. Biophys.* 159 (1973) 813–820.
- 16 R. P. Levine, W. G. Burton und H. A. Duram: *Nature New Biol.* 273 (1972) 176–177.
- 17 R. P. Levine und H. A. Duram: *Biochem. Biophys. Acta* 325 (1973) 565–572.
- 18 A. Boschetti, V. Niggli, U. Otz und T. Wiedmer: *Physiol. Plant.* 31 (1974) 169–174.
- 19 D. P. Beck und R. P. Levine: *J. Cell Biol.* 63 (1974) 759–772.