

Isolierung von phosphatbindenden Membranfragmenten bei *Rhodospirillum rubrum*

Von

HANS LUTZ

Institut für Allgemeine Botanik der Universität Zürich

Einleitung

Chromatophoren, isoliert aus dem photosynthetischen Bakterium *Rhodospirillum rubrum* (Abb. 1), zeigen bei Belichtung gekoppelt zum Elektronentransport sowohl eine Bildung von ATP (FRENKEL, 1954) wie auch, in Abwesenheit von ADP, eine solche von Pyrophosphat (BALTSCHIEFFSKY et al. 1966). Versuche mit Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten führten zur Hypothese von zwei, heute noch nicht identifizierten, energiereichen Zwischenprodukten bei der Bildung von ATP oder PP (vgl. Abb. 3). Von diesen nur indirekt nachweisbaren Zwischenprodukten scheint das erste nicht phosphoryliert zu sein, während im zweiten die Phosphatgruppe in energiereicher Bindung vorliegt. Unabhängig davon, ob das erste Zwischenprodukt ein pH-Gradient, eine bestimmte Substanz oder eine energiereiche Proteinkonformation darstellt, muss das zweite, phosphorylierte Produkt, über eine chemische Reaktion unter Verbrauch der Energie des ersten hervorgegangen sein. Da der Elektronentransport an die Chromatophorenmembran gebunden ist, scheint es wahrscheinlich, dass das Phosphatmolekül mindestens temporär an Proteine der Membran angelagert wird, wo die Veresterung erfolgen kann. Bis heute liess sich in phosphorylierenden Organellen nie ein freies, lösliches und energiereiches Zwischenprodukt nachweisen, das in der Lage gewesen wäre, im Dunkeln zusammen mit ADP ATP zu synthetisieren. Die Vermutung liegt nahe, dass das phosphorylierte Intermediärprodukt membrangebunden bleibt. So postulierten WADKINS und LEHNINGER (1958) einen Enzym-Phosphatkomplex und CROSS et al. (1970) konnten bei Mitochondrien, HINKSON und BOYER (1965) bei Chloroplasten bereits unlösliche Proteine finden, die rascher phosphoryliert werden als ATP. Die folgenden Fragestellungen liegen dieser Arbeit zugrunde:

1. Binden die Chromatophorenmembranen von *Rhodospirillum rubrum* Phosphat?
2. Ist die Bindung im Licht stimuliert?
3. Wie sind die Bedingungen für optimale Phosphatbindung verglichen mit der Bildung des phosphorylierten Zwischenproduktes?

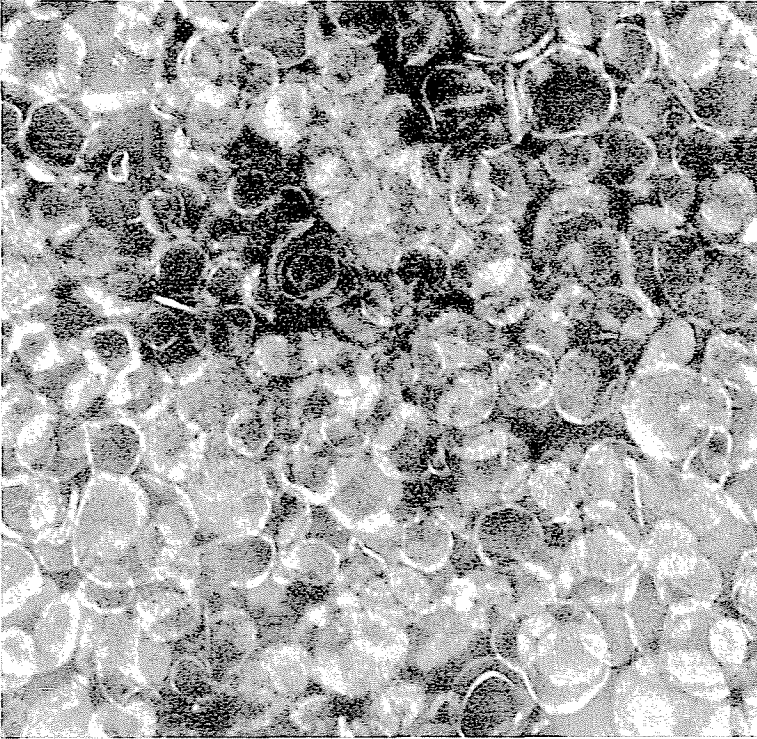


Abb. 1. EM-Bild mit Negativkontrast des einmal mit Puffer gewaschenen Sedimentes von Chromatophoren, isoliert aus *Rhodospirillum rubrum* (mittlerer Durchmesser: 100 nm). (Aufnahme: E. Wehrli, ETH.) Vergr. 97 000 \times .

Methodik

Zur Analyse des membrangebundenen Phosphats verwendeten wir vor allem die Membranfiltrationstechnik auf drei verschiedene Arten (LUTZ und BACHOFEN, 1972):

- A Direkte Membranfiltration des Reaktionsgemisches.
- B Trennung der Chromatophoren vom Reaktionsgemisch im Dichtegradienten mit dem Zonalrotor und anschliessend Membranfiltration.
- C Chromatographie über Sephadex G 25 zur Separierung der Partikel mit gelösten Proteinen vom Reaktionsgemisch, anschliessend Membranfiltration.

Die wichtigsten Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden sind folgende:

Die direkte Membranfiltration erlaubt zwar eine rasche Erfassung, nach 5 min sind die Chromatophoren vom Reaktionsgemisch getrennt, hat jedoch den Nachteil, dass infolge der hohen ^{32}P Aktivität durch Adsorption von Phosphat auf dem Membranfilter mit einem hohen Blindwert und einer grossen Streuung zu rechnen ist. Zudem ist nicht auszuschliessen, dass auch kleinmolekulare Produkte an das Filter gebunden bleiben.

Die Zentrifugation im Dichtegradienten liefert eine saubere Trennung der Chromatophoren von kleineren Partikeln, von gelösten Proteinen und vom Reaktionsgemisch. Weiter wird durch die Saccharose im Gradienten mitgeschlepptes Phosphat, das nicht gebunden ist, zum grössten Teil herausgewaschen. Der Nachteil liegt in der Dauer der Auftrennung, welche bis zur Membranfiltration kaum in weniger als 30 Minuten durchgeführt werden kann, was bei einem eventuell energiereichen Produkt mit einer geringen Halbwertszeit nachteilig ist. Die vorgängige Chromatographie über Sephadex G 10 oder G 25 lässt sich innerhalb von ca. 7 min durchführen, erlaubt also zusätzlich eine Analyse der ATP-Bildungskapazität, doch trennt sie lediglich die Chromatophoren zusammen mit den kleineren Partikeln und mit den gelösten Proteinen vom Reaktionsgemisch.

Durchführung der Zonalzentrifugation: Die unter bestimmten Bedingungen inkubierte Chromatophorensuspension wurde möglichst rasch in den Zonalrotor gebracht und zentrifugiert. Die Zentrifugation erfolgte in einem Saccharosegradienten [500 ml, exponentiell von a) 10–25% Saccharose, resp. b) 3–8% Saccharose, je enthaltend 10^{-3} m MgCl_2 und Tris-Maleat, pH 6,0, 10^{-2} m]. Die Zentrifugation war ursprünglich für die Trennung der niedermolekularen, löslichen Stoffe von den inaktiven, kleinen Membranfragmenten und den eigentlichen, photosynthetisch aktiven Chromatophoren ausgearbeitet worden. Die Zentrifugation wurde bei 0° in einem Ti-14-Rotor in einer Spinco L-50 Zentrifuge durchgeführt; als Zentrifugationszeit im Gradienten a) wurde 69 Minuten (15' Beschleunigungszeit, 45 Min. bei 45 000 Upm, 9 Min. Bremszeit) gewählt, im flacheren Gradienten b) liess sich die Zentrifugationszeit auf 16 Minuten reduzieren (10' Beschleunigung auf 37 000 Upm, Bremszeit 6'). Schliesslich wurde, um die Zeit zwischen der Trennung der Chromatophoren und der Reaktion derselben mit ADP zu verringern, das ADP-Reagens mit Mg^{2+} und Puffer in den Gradienten selbst eingebaut. Die aktive Chromatophorenfraktion sammelte sich in allen Fällen isopyknisch im Kissen (2 m Saccharose); das Ergebnis solcher Zentrifugationen ist in Abb. 2 dargestellt. Nach dem Abbremsen wurde der Inhalt des Rotors abgepumpt und unter (kontinuierlicher) Aufnahme der Absorption bei 254 nm fraktioniert. Die anschliessenden Untersuchungen richteten sich ausschliesslich auf die im Kissen konzentrierten Chromatophoren. Neben der direkten Membranfiltration (Millipore, Porenweite 100 nm) wurden Teile davon mit ADP inkubiert, um neben den bereits verestert vorliegenden Phosphaten (AVRON 1960) auch die ATP-Bildungskapazität zu erfassen. Als Bezugsgrösse wurde der Bacteriochlorophyllgehalt (SMITH und BENITEZ 1965) gewählt.

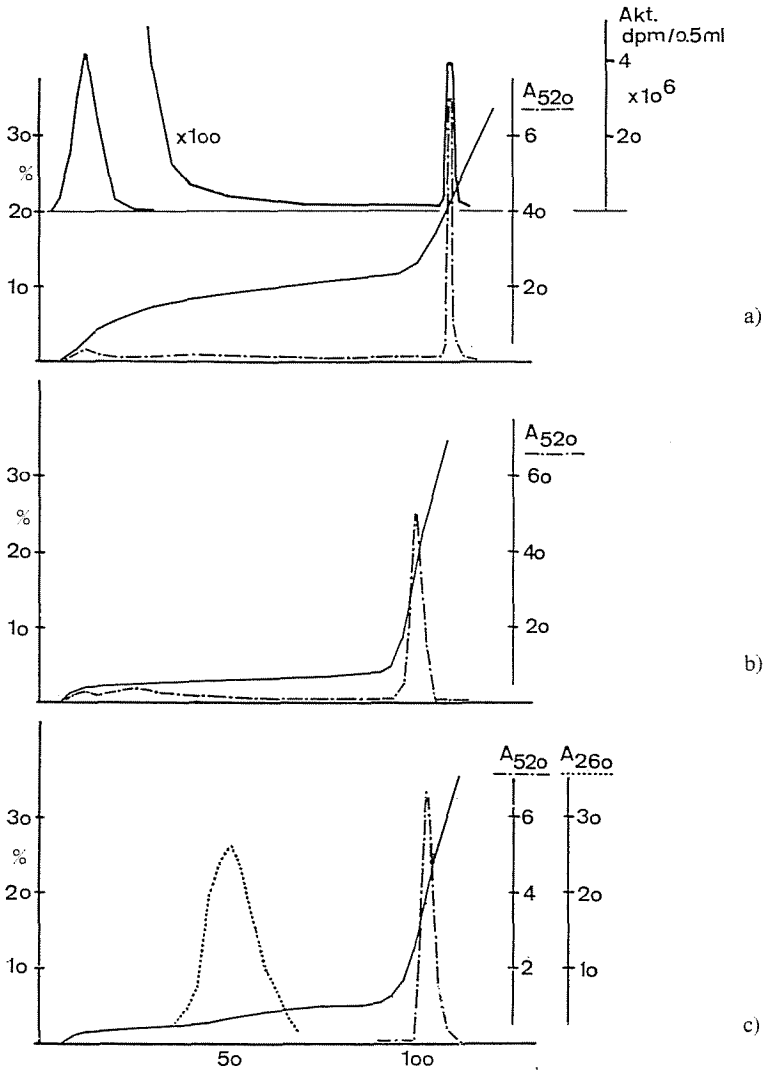


Abb. 2. Sedimentationsprofile nach Zonalzentrifugation von *R. rubrum* Chromatophoren. Zentrifugationszeiten: a) 60 min bei 45 000 Upm, b) und c) 15 min bei 45 000 Upm, Ti 14 Rotor, Spinco L 50.

Saccharose	—————
Extinktion bei 520 nm	- - - - -
Extinktion bei 260 nm (nur in c)
Radioaktivität in dpm/0,5 ml (nur in a)	—————

Resultate

Ein Beispiel von drei verschiedenen Zonaltrennungen ist in Abb. 2 dargestellt; darin festgehalten sind Dichteverlauf des Gradienten (refraktometrisch ermittelt), Absorption bei 520 nm und diejenige bei 260 im Gradienten c). Interessant scheint dabei, dass die mittleren Fraktionen der leichten Membranfragmente keine über dem Hintergrund liegende Radioaktivität aufweisen, sondern dass letztere ausschliesslich auf die lösliche Fraktion und die intakten Membranfragmente oder Chromatophoren beschränkt ist (2a).

Tab. 1. Analyse der Chromatophorenfraktionen nach Zonzentrifugation nach Licht- und Dunkel-Vorinkubation.

Reaktionsbedingungen wie angegeben.

Reaktionsmedium: Chromatophoren 333 μ g BChl/ml, $MgCl_2$ 10 mM, Ascorbat 1 mM, $PMS \cdot 10^{-5}$ m, Serumalbumin 1 mg/ml, Tris-Maleat Puffer pH 6,0, 60 mM, KCl 10 mM, Saccharose 80 mM, wo angegeben: $NaH_2^{32}PO_4$ pH 6,0 5 mM, ADP pH 6,0, 5 mM. ADP-Reagens (im Verhältnis 3 zu 1 mit einem Aliquot der Chromatophorenfraktion gemischt): Ascorbat 1 mM, $MgCl_2$ 10 mM, Serumalbumin 1 mg/ml, Tris-HCl Puffer pH 8,0 150 mM, ADP pH 8,0 2 mM.

Inkubations- Bedingungen	Total in Chromatophoren Fraktion nMol P/mg BChl	Chromatophoren- membran gebunden nMol P/mg BChl	Direkt verestert in Chromato- phoren Fraktion nMol P/mg BChl	Indir. verestert in Chromatophoren
				Fraktion (nach Inkubation mit ADP) nMol P/mg BChl
4' dunkel, $\pm^{32}P$	70,5	6,9	3,5	2,8
4' Licht, $\pm^{32}P$	43,5	12,9	3,4	2,3
4' Licht, $\pm^{32}P \pm ADP$	46,7	12,4	4,0	3,5

Vorinkubation: 10' bei 20°, radioaktives P bzw. PP und Reaktionsgemisch getrennt

Wie Tab. 1 zeigt, ist das an die Chromatophorenmembran gebundene Phosphat im Licht doppelt so gross wie im Dunkeln. Fügt man dem Inkubationsmedium ADP zu und belichtet, so wird etwa gleichviel Phosphat an die Membranen gebunden wie im Licht in Abwesenheit von ADP. Falls es sich beim membrangebundenen Phosphat um ein energiereiches Zwischenprodukt der Phosphorylierung handelt, wäre in Gegenwart von ADP weniger Phosphat in membrangebundenem Zustand zu erwarten, da ADP mit diesem konkurriert. Dies lässt sich in diesem, über 90 Minuten dauernden Versuch nicht zeigen, kann aber nicht ausgeschlossen werden.

Die in der Kolonne «verestertes Phosphat» angegebenen Werte beziehen sich auf das im gleichen Versuch in der Chromatophorenfraktion ohne Zugabe von ADP verestert vorliegende Material nach Fällung mit Perchlorsäure. Nur die Hälfte des im Dunkeln an Membranen sitzenden Phosphats scheint also in verestertem Zustand vorzuliegen. Beim Versuch nach Licht-Inkubation ist der Betrag an verestertem Phosphat gleich gross wie im Dunkeln. Das im Licht an die Membran gebundene Phosphat scheint demnach leicht abtrennbar und säurelabil zu sein. Chromatogramme des Überstandes nach Fällung mit Perchlorsäure wiesen jedenfalls als einzige radioaktive Verbindung nur anorganisches Phosphat auf. Im Dunkeln mit

Pyrophosphat behandelte Chromatophoren enthalten mehr Membran-Phosphat als diejenigen, welche mit Phosphat im Dunkeln gehalten worden waren. Falls es sich beim membrangebundenen Phosphat um eine energiereiche Verbindung handelt, müsste Pyrophosphat nach den Untersuchungen von M. BALTSCHJEFFSKY (1967) dieses zu bilden in der Lage sein. Untersucht man die Wirkung von Pyrophosphat bei verschiedenen Temperaturen (Tab. 2), kann beobachtet werden, dass bei physiologischen Temperaturen bis 4mal mehr Phosphat an die Membranen gebunden wird als in der Kälte.

Tab. 2. Einfluss von Pyrophosphat im Dunkeln auf den Membran-P-Gehalt in der zonalzentrifugierten Chromatophorenfraktion.

Reaktionsbedingungen wie angegeben.

Reaktionsmedium: Chromatophoren 460 μg BChl/ml, MgCl_2 10 mM, Ascorbat 1 mM, PMS $5 \cdot 10^{-5}$ m, Serumalbumin 1 mg/ml, Saccharose 125 mM, Tris-Maleat Puffer pH 6,0 90 mM, KCl 10 mM, $\text{Na-}^{32}\text{PP}$ 5 mM.

Inkubations- Bedingungen	Total in Chromatophoren Fraktion nMol P/mg BChl	Chromatophoren- membran- gebunden nMol P/mg BChl	Direkt verestert nMol P/mg BChl	Indirekt verestert in Chromatophoren Fraktion nMol P/mg BChl
dunkel, 0° + ³² PP	44,2	14,4	13,8	10,4
dunkel, 25°				
7' ohne, 5' + ³² PP	117,6	54,0	111,2	24,2

Wie von HIND und JAGENDORF (1963) und anderen gezeigt, ist die Bildung des phosphorylierten Zwischenproduktes durch Chloroplasten bei pH 6,0 wesentlich grösser als bei pH 8, das Zwischenprodukt bei erniedrigtem pH offensichtlich stabiler. Eine gleiche Beobachtung lässt sich auch bezüglich der Fähigkeit machen, Phosphat an die Membranfragmente zu binden (Tab. 3).

Tab. 3. Einfluss des pH auf den lichtinduzierten Membran-P-Gehalt in der zonalzentrifugierten Chromatophorenfraktion.

Reaktionsbedingungen wie angegeben.

Reaktionsmedium: Chromatophoren 420 μg BChl/ml, MgCl_2 10 mM, Ascorbat 1 mM, PMS $5 \cdot 10^{-5}$ m, Serumalbumin 1 mg/ml, Tris-Maleat Puffer pH 6,8 80 mM, bzw. Tris-Maleat Puffer pH 8,0 80 mM, KH_2 ³²PO₄ 5 mM.

Inkubations- Bedingungen	Total in Chromatophoren Fraktion nMol P/mg BChl	Chromatophoren- membran- gebunden nMol P/mg BChl
3' Licht, pH 8,0, + ³² P	29,2	8,8
3' Licht, pH 6,0, + ³² P	36,8	15,5

Vorinkubation: 10' bei 20°, radioaktives P und Reaktionsgemisch getrennt

Schliesslich sei noch die Wirkung einer Proteinfraction genannt, welche bei der Isolierung der Chromatophoren aus dem Überstand gewonnen werden kann. Diese scheint als Kopplungsfaktor für die Phosphorylierung zu wirken. Die Zugabe zum

Phosphorylierungsmedium bewirkt eine Steigerung der ATP-Synthese im Licht, gleichzeitig findet man eine stark reduzierte Bindung von Phosphat an die Chromatophoren, gemessen nach 90 Minuten (Tab. 4).

Tab. 4. Einfluss der Proteinfraction des Überstandes auf den lichtinduzierten Membran-P-Gehalt in der zonalzentrifugierten Chromatophorenfraktion.

Reaktionsbedingungen wie angegeben.

Reaktionsmedium: Chromatophoren 170 μ g BChl/ml, $MgCl_2$ 10 mM, Ascorbat 1 mM, $PMS \cdot 10^{-5}$ m, Tris-Maleat Puffer pH 6,0 50 mM, Serumalbumin 1 mg/ml, Saccharose 80 mM, $KH_2^{32}PO_4$ 5 mM, Proteinfraction des Überstandes (nach erster Ultrazentrifugation bei der Isolierung der Chromatophoren) über Sephadex G 25 entsalzt und anschliessend 3 Stunden gegen obigen Puffer dialysiert, Endkonzentration im Reaktionsmedium: 0,8 mg Protein/ml.

Inkubations- Bedingungen	Total in Chromatophoren Fraktion nMol P/mg BChl	Chromatophoren- membran gebunden nMol P/mg BChl
3' Licht, pH 6,0, $\pm^{32}P$	64,8	30,5
3' Licht, pH 6,0, $\pm^{32}P$ \pm Proteinfraction	53,0	11,0

Vorinkubation: 10' bei 20°, radioaktives P und Reaktionsgemisch getrennt

Diskussion

Die in der Einleitung gestellten Fragen lassen sich positiv beantworten: Chromatophoren binden Phosphat an die Membran, Licht stimuliert den Vorgang. Ferner stimmen die Eigenschaften des unbekanntes, phosphoryliertes Intermediärproduktes und der Phosphatbindung an die Membran darin überein, dass letztere bei tieferem pH stimuliert ist; sie wird reduziert durch die Gegenwart eines Kopplungsfaktors und von endogenem ADP und kann ferner auch im Dunkeln durch Pyrophosphat erreicht werden (Abb. 3).

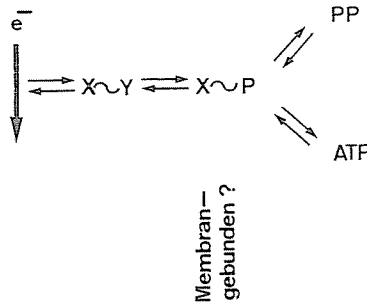


Abb. 3.

Eine Identität des energiereichen Zwischenproduktes mit dem membrangebundenen Phosphat ist aber erst dann gegeben, wenn es nach der Trennung vom Reaktionsgemisch zusammen mit ADP im Dunkeln noch ATP zu synthetisieren

vermag. Dies war mit den nach dem ursprünglichen Zonaltrennverfahren erhaltenen Chromatophoren nicht möglich, da die Auftrennung, verglichen mit der Halbwertszeit des Zerfalls des Zwischenproduktes, zu lange dauerte. In Chloroplasten besitzt das phosphorylierte Zwischenprodukt nach verschiedenen Autoren bei 20° in Gegenwart des Reaktionsgemisches nur eine Halbwertszeit von 5–20 Minuten. Obwohl angenommen werden darf, dass die Zerfallszeit unter den hier beschriebenen Bedingungen – erniedrigte Temperatur und rasches Abtrennen der Chromatophoren vom Reaktionsgemisch – sicher länger ist, muss die Trenndauer verkürzt werden. Durch die Änderung der Steilheit des Gradienten (siehe Methoden) ist eine Reduktion der gesamten Trennzeit auf etwa 30 Minuten möglich. Ein anderer Weg zur Lösung dieses Problems liegt schliesslich darin, die Bildung von ATP aus ADP und Membranphosphat im Rotor selbst ablaufen zu lassen durch die Einführung einer Bande, welche ADP und die zur Phosphorylierung notwendigen Kofaktoren enthält. Die Resultate dieser letztgenannten Versuche werden an anderer Stelle diskutiert.

Dem Schweizerischen Nationalfonds danke ich für die zur Verfügung gestellten finanziellen Mittel. Er ermöglichte es, im Rahmen eines an Prof. Dr. R. BACHOFEN erteilten Forschungskredits diese Untersuchungen durchzuführen.

Liste der Abkürzungen:

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BChl	Bakteriochlorophyll
P	anorganisches Phosphat
PP	anorganisches Pyrophosphat
PMS	Phenazinmethosulfat

Zitierte Literatur

- AVRON, M.: Photophosphorylation by swiss-chard chloroplasts. *Biochim. biophys. Acta* 40, 257 (1960).
- BALTSCHOFFSKY, H., L. V. VON STEDINGK, H.-W. HELDT and M. KLINGENBERG: Inorganic pyrophosphate: formation in bacterial photophosphorylation. *Science N.Y.* 153, 1120 (1966).
- BALTSCHOFFSKY, M.: Inorganic pyrophosphate and ATP as energy donors in chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. *Nature, London* 216, 241 (1967).
- CROSS, R. L., B. A. CROSS and J. H. WANG: Detection of a phosphorylated intermediate in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 40, 1155 (1970).
- FRENKEL, A. W.: Light-induced phosphorylation by cell free preparations of photosynthetic bacteria. *J. Am. chem. Soc.* 76, 5568 (1954).
- HIND, G. and A. T. JAGENDORF: Separation of light and dark stages in photophosphorylation. *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 49, 715 (1963).
- HINKSON, J. W. and P. D. BOYER: The light induced formation of rapidly phosphorylated compounds in chloroplasts. *Archs. Biochem. Biophys.* 110, 16 (1965).
- LUTZ, H. U. und R. BACHOFEN: Photophosphorylierung und Phosphatbindung an Chromatophoren von *Rhodospirillum rubrum*. *Zbl. Bakt. I. Orig.* (1972) im Druck.
- SMITH, J. H. S. and A. BENITEZ: Chlorophylls. In: *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Bd. 4, ed. P. PAECH and M. V. TRACEY, Berlin, Göttingen, Heidelberg, Springer, p. 182 (1955).