

Stadienspezifische Thylakoiddifferenzierung der Endocyanelle *Cyanocyta korschikoffiana* in der symbiotischen Assoziation mit *Cyanophora paradoxa*

Growth Specific Thylakoid Differentiation of the Endocyanelle
Cyanocyta korschikoffiana in the Symbiotic Association with *Cyanophora paradoxa*

Peter Brandt, Sabine Marten, Birgit Müller und Wolfgang Wießner

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

Z. Naturforsch. 37 c, 75–80 (1982); received October 21, 1981

Thylakoid Differentiation, Endocyanelles, *Cyanophora paradoxa*, Energy Transfer, Phycobilin

The thylakoid differentiation in the endosymbiotic cyanelle *Cyanocyta korschikoffiana* depends on the developmental stage of the whole symbiotic association *Cyanophora-Cyanocyta*. During culturing under permanent light the intrinsic or extrinsic location and the amount of the chlorophyll-protein complexes and of the phycobilines in the thylakoids change markedly. During this modification of the thylakoids the reaction centers of photosystem I and II are more and more protected by other proteins. Moreover the amount of phycobilisomes increases in relation to the amount of the chlorophyll-protein complexes. The energy transfer becomes more and more efficient. All these aspects show the typical behaviour of a mass culture of a free-living blue-green alga and imply that *Cyanocyta korschikoffiana* is a symbiotic cyanelle much more than a chloroplast-like organelle.

Cyanocyta korschikoffiana [1] tritt nur in Assoziation mit der apochlorotischen Cryptomonade *Cyanophora paradoxa* [2] auf. Im Gegensatz zu freilebenden Cyanophyceen ist damit diese Blaualge [3] abgeschirmt von der direkten Einwirkung drastischer äußerer Milieuänderungen, aber auch angewiesen auf die durch *Cyanophora paradoxa* vorgegebenen Lebensbedingungen. Zum harmonischen Ablauf der offensichtlich sehr engen Assoziation zwischen *Cyanophora* und *Cyanocyta* [4] ist eine Vielzahl von Regelmechanismen zu fordern wie dies vergleichsweise für das geregelte Zusammenwirken von Nucleocytoplasma und Chloroplasten bei eukaryotischen Organismen wie z. B. *Euglena gracilis* bekannt ist [5–11]. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, an Hand der Thylakoiddifferenzierung in *Cyanocyta korschikoffiana* einerseits ihre Abhängigkeit vom Entwicklungszustand einer Massenkultur von *Cyanophora paradoxa* nachzuweisen und andererseits am Verlauf der Differenzierung die Verwandschaft von *Cyanocyta korschikoffiana* mit freilebenden Cyanophyceen aufzuzeigen.

Abkürzungen: DCPIP, Dichlorphenolindophenol; PS, Photosystem; SDC, Natriumdesoxycholat; SDS-PAGE, Natriumdodecylsulphat-Polyacrylamideelektrophorese; TRICIN N-(Tris-(hydroxymethyl)-methyl)-glycin.

Reprint requests to Dr. Peter Brandt.

0341-0382/82/0100-0075 \$ 01.00/0

Material und Methoden

Cyanophora paradoxa (Sammlung von Algenkulturen des Pflanzenphysiologischen Institutes Göttingen) wurde nach der Methode von Marten *et al.* [12] kultiviert.

Die photosynthetische Sauerstoffproduktion der intakten Symbioseeinheit wurde polarographisch mit Hilfe einer Clark-Elektrode bestimmt.

Die Endocyanellen wurden isoliert [13] und osmotisch aufgebrochen [8]. Der Membranabbau erfolgte nach Bar-Nun und Ohad [14], die nachfolgende SDS-PAGE nach Brandt [8]. Die Absorptionsspektren der Chlorophyll-Protein Komplexe bzw. der Phycobilin wurden ohne Herauslösen aus dem Gel mit einem Shimadzu UV-Vis Zweistrahl-Spektrophotometer Modell UV-200 aufgenommen.

Zur Bestimmung der Aktivität von PS I bzw. PS II wurden die Thylakoide nach dem osmotischen Zellaufbruch durch Zentrifugation (30 min, 8000 × g) isoliert. Diese isolierten Thylakoide wurden einerseits direkt zur Bestimmung der photosynthetischen Aktivität mittels künstlicher e⁻-Donatoren und -Akzeptoren (Methyviologen- bzw. DCPIP-Reduktion) verwendet [15]. Andererseits wurden aus ihnen durch Behandlung mit Triton X-100 (1%, 30 min) Thylakoid-Partikel herausgelöst. Diese waren Ausgangsmaterial für eine weitere Bestimmung der PS I- und PS II-Aktivität [15] und für die quantitative Isolie-

rung von Chlorophyll-Protein Komplexen und Phycobilinen durch Gelfiltration an AcA 34 (LKB, Bromma, Schweden). Als Elutionspuffer diente ein TRICIN-KCl-Puffer (25 mM TRICIN, 50 mM KCl, pH 6,8). Fluoreszenzemissionsspektren wurden nach dem Verfahren von Harnischfeger [16] aufgenommen.

Ergebnisse

Grundlage der Untersuchungen war die nach Marten et al. [12] optimierte Dauerlichtkultur von *Cyanophora paradoxa* mit einer lag-Phase von etwa 1,5 Tagen ($0,5 \times 10^6$ Zellen/ml), einer log-Phase von etwa 4 Tagen (15×10^6 Zellen/ml) und einer stationären Phase von etwa 2 Tagen (30×10^6 Zellen/ml).

Proteinspektren der Thylakoide

Aus autotroph kultivierter *Cyanophora paradoxa* isolierte Cyanellen wurden osmotisch aufgebrochen [8], die löslichen Proteine von den Membranen abgetrennt und letztere durch Behandlung mit Sodiumdesoxycholat (SDC) stufenweise abgebaut [8, 14]: Inkubation mit 0,1% SDC und anschließende Zentrifugation ergibt im Überstand die 1. Membranfraktion; Inkubation des Pellets mit 0,75% SDC

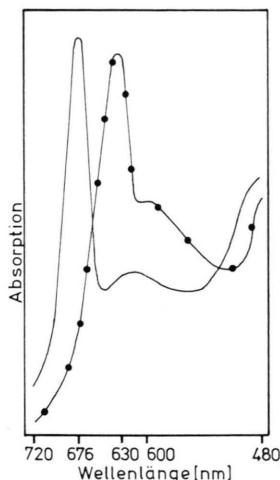


Abb. 2. Absorptionsspektren der durch SDS-PAGE isolierten Phycobiline bzw. Chlorophyll-Protein Komplexe aus den Thylakoiden von *Cyanocyta korschikoffiana*.

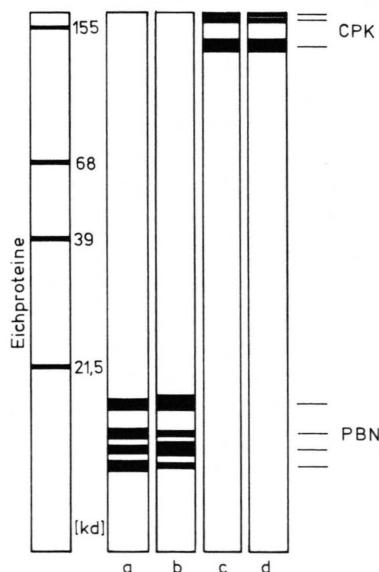


Abb. 1. Generelles Verteilungsmuster der Phycobiline (PBN) bzw. der Chlorophyll-Protein Komplexe (CPK) von *Cyanocyta korschikoffiana* in der löslichen Fraktion (a) und der 1.-3. Membranfraktion (b-d) nach einer SDS-PAGE.

und anschließende Zentrifugation ergibt im Überstand die 2. und im Pellet die 3. Membranfraktion. Diese drei Membranfraktionen sowie die Fraktion der löslichen Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt [8] und so die Pigment-Protein Komplexe der vier Fraktionen voneinander getrennt (Abb. 1). Sieben Pigment-Protein Komplexe wurden sichtbar: drei Chlorophyll-Protein Komplexe ($M_r: > 160$, 160 und 135 kd) mit einem Absorptionsmaximum bei 676 nm (Abb. 2) und vier Phycobilin ($M_r: 16,5$, 13,5, 12 und 11 kd) mit Absorptionsmaxima bei 630 und 600 nm (Abb. 2).

Während die überwiegende Menge der Phycobiline in der löslichen Fraktion und in der 1. Membranfraktion vorhanden ist, sind die drei Chlorophyll-Protein Komplexe nur in der 2. und 3. Membranfraktion zu finden. Es handelt sich also bei letzteren um „intrinsic“-Proteine von *Cyanocyta korschikoffiana* ähnlich wie bei *Plectonema boryanum* [17], während die Phycobilin als „extrinsic“-Proteine anzusprechen sind [4].

Das generelle Verteilungsmuster der Chlorophyll-Protein Komplexe und der Phycobiline von *Cyanocyta korschikoffiana* auf die vier Fraktionen ist quantitativ nicht statisch, sondern hängt in charakteristischer Weise vom Entwicklungszustand von *Cyanophora paradoxa* ab (Tab. I–III). Im Laufe des Wachstums einer *Cyanophora*-Kultur steigt der prozentuale Anteil der Phycobilin in der löslichen Fraktion von 46% auf 54% und in der 1. Membran-

Tab. I. Gehalt der löslichen Fraktion an Phycobilinen in der lag-, log- und stationären Phase einer Massenkultur von *Cyanophora paradoxa*.

M_r [kd]	lag-Phase Proteinanteile		log-Phase Proteinanteile		stationäre Phase Proteinanteile	
	[rel. E.] [%]	[rel. E.] [%]	[rel. E.] [%]	[rel. E.] [%]	[rel. E.] [%]	[rel. E.] [%]
16,5	11	24	14	24	16	30
13,5	12	26	17	29	14	26
12	14	30	14	24	12	22
11	9	20	13	23	12	22
gesamt	46	100	58	100	54	100

Tab. II. Gehalt der 1. Membranfraktion an Phycobilinen in der lag-, log- und stationären Phase einer Massenkultur von *Cyanophora paradoxa*.

M_r [kd]	lag-Phase Proteinanteile		log-Phase Proteinanteile		stationäre Phase Proteinanteile	
	[rel. E.] [%]	[rel. E.] [%]	[rel. E.] [%]	[rel. E.] [%]	[rel. E.] [%]	[rel. E.] [%]
16,5	7	22	21	36	17	30
13,5	6	19	9	16	10	19
12	11	34	21	36	19	34
11	8	25	7	12	10	17
gesamt	32	100	58	100	56	100

fraktion von 32% auf 56%. Dabei verschiebt sich außerdem in der löslichen Fraktion der Hauptanteil der Phycobiline vom PBN mit dem M_r von 12 kd in der lag-Phase auf das PBN mit dem M_r von 13,5 kd in der log-Phase und von dort auf das PBN mit dem M_r von 16,5 kd in der stationären Phase. In der 1. Membranfraktion bleibt die dominierende Rolle des PBN mit dem M_r von 12 kd immer erhalten. In der log-Phase und in der stationären Phase verstärkt sich zusätzlich der Anteil des PBN mit dem M_r von 16,5 kd. Parallel zu dieser Zunahme der Phycobiline

sinkt der Gehalt an Chlorophyll-Protein Komplexen in der 3. Membranfraktion stark ab, während er in der 2. Membranfraktion während des Wachstumsverlaufs ansteigt.

Sauerstoffproduktion, PS I- und PS II-Aktivität

Die wachstumsspezifischen Veränderungen des Thylakoidsystems müssen sich notwendigerweise auf die photosynthetische Leistung der Endocyanellen auswirken, von der das Überleben der obligat autotrophen Assoziation *Cyanophora-Cyanocysta* abhängt.

Die photosynthetische Sauerstoffproduktion ändert sich in Abhängigkeit von der Wachstumsphase (Tab. IV). Ähnlich wie bei Massenkulturen unicellulärer Algen wird mit zunehmendem Alter der *Cyanophora*-Kultur der Kompensationspunkt bereits bei niedrigeren Belichtungsstärken erreicht. Damit parallel sinkt der Wert für die maximale Sauerstoffproduktion um etwa 70% ab. Jedoch wird dieser Wert in der stationären Phase noch bei Belichtungsstärken über 30 000 Lux erreicht, während das Thylakoidsystem jüngerer *Cyanophora*-Kulturen bei diesem Starklicht geschädigt wird.

Detailiertere Auskunft über die Thylakoidorganisation erbringt die Untersuchung der PS I- bzw. PS II-Aktivität unter Einsatz künstlicher e⁻-Donatoren und -Akzeptoren. Dazu wurden zum einen die aus isolierten und dann osmotisch aufgebrochenen Cyanellen präparierten Thylakoide und zum anderen die aus den isolierten Thylakoiden nach Behandlung mit Triton X-100 (1%) herausgelösten Thylakoidpartikel verwendet (Tab. V). In der lag-Phase ist keine PS I-Aktivität nachweisbar, die PS II-Aktivität bei den Thylakoidpartikeln liegt im Vergleich mit der ganzer Thylakoide bei einem um das 10fache höheren Wert. Während der log-Phase weisen die Thylakoide und die Thylakoidpartikel

Table III. Gehalt der 2. und 3. Membranfraktion an Chlorophyll-Protein Komplexen in der lag-, log- und stationären Phase einer Massenkultur von *Cyanophora paradoxa*.

M_r [kd]	Membran- fraktion	lag-Phase Proteinanteile		log-Phase Proteinanteile		stationäre Phase Proteinanteile	
		[rel. E.]	[%]	[rel. E.]	[%]	[rel. E.]	[%]
135 – 160	2.	62	61	66	64	88	85
	3.	40	39	37	36	16	15
gesamt		102	100	103	100	104	100

Tab. IV. Photosynthetische Sauerstoffproduktion von *Cyanophora paradoxa* aus der lag-, log- und stationären Phase in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke.

	lag-Phase	log-Phase	stationäre Phase
Kompensationspunkt (lux)	370	300	150
Lichtsättigung (lux)	11 000	15 000	10 500
Lichtschädigung (lux)	> 30 000	> 30 000	keine
max. Sauerstoffproduktion ($\times 10^{-3} \mu\text{M O}_2/\mu\text{g Chlorophyll} \cdot \text{min}$)	28,1	31,7	8,2

etwa gleich hohe PS I- bzw. PS II-Aktivitäten auf. Im Gegensatz dazu liegt die Aktivität der Thylakoidpartikel in der stationären Phase um das 17fache (PS I) bzw. um rund das 3fache (PS II) höher als die der ganzen Thylakoide. Diese insgesamt uneinheitliche Entwicklung der meßbaren photosynthetischen Aktivitäten spricht für eine Abfolge unterschiedlicher Differenzierungsvorgänge während des Kulturverlaufs [8, 15].

Quantitative Erfassung von Chlorophyll-Protein Komplexen (CPK) und Phycobilinen (PBN)

Die aus isolierten Cyanellen durch Triton X-100 (1%) herausgelösten Pigment-Protein Komplexe wurden durch Gelfiltration (AcA 34; LKB) in eine Fraktion von Chlorophyll-Protein Komplexen (CPK) und eine von Phycobilinen (PBN) aufgetrennt (Abb. 3). Die Fraktionen zeichnen sich durch eine hohe Absorption bei 676 nm bzw. 622 nm aus. Während sich das Mengenverhältnis von PBN zu CPK zur lag- und log-Phase nicht wesentlich unter-

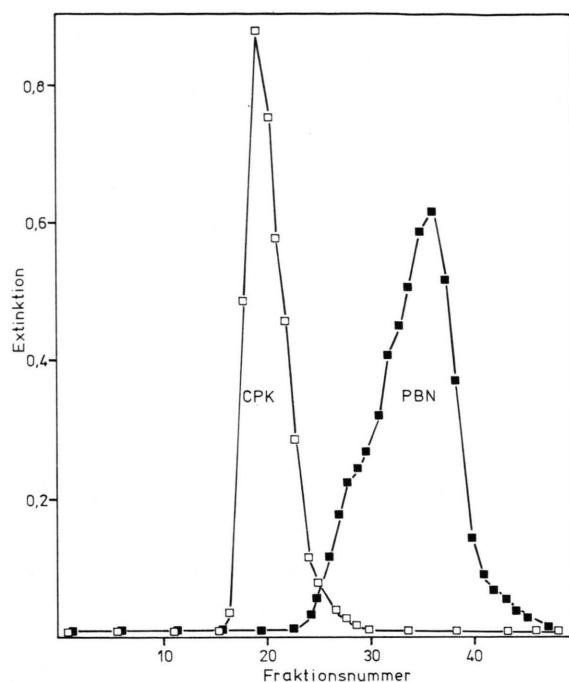


Abb. 3. Elutionsdiagramm einer Gelfiltration von Triton X-100 löslichen Pigment-Protein Komplexen (CPK = Chlorophyll-Protein Komplexe, PBN = Phycobilin) aus *Cyanocyta korschikoffiana* in der log-Phase einer *Cyanophora*-Massenkultur. Säulenfüllung: AcA 34, LKB; Elutionspuffer: TRICIN-KCl-Puffer (25 mM TRICIN, 50 mM KCl, pH 6,8). □—□ = Extinktion bei 676 nm, ■—■ = Extinktion bei 622 nm.

scheidet (1:1,1 bzw. 1:1,2), nimmt die Fraktion PBN in der stationären Phase auf das Doppelte zu (1:2,5).

Effizienz der Energieleitung

Das Fluoreszenzemissionsspektrum (Abb. 4) von *Cyanophora paradoxa* zeigt fünf Emissionsbanden

Tab. V. PS I- bzw. PS II-Aktivität von Thylakoiden bzw. Thylakoidpartikeln aus *Cyanocyta korschikoffiana* zu verschiedenen Entwicklungsstadien einer Massenkultur von *Cyanophora paradoxa*.

Wachstumsphase	PS I-Aktivität (gemessen als Methylviologen-Reduktion) [rel. E.]		PS II-Aktivität (gemessen als DCMU-sensitive DCPIP-Reduktion) [rel. E.]	
	isolierte Thylakoide	Thylakoidpartikel	isolierte Thylakoide	Thylakoidpartikel
lag	0	0	5	50
log	65	72	65	56
stat.	20	340	50	140

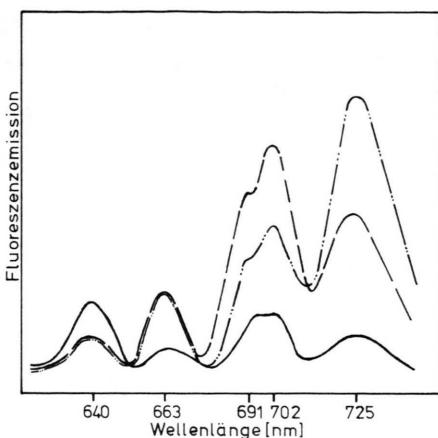


Abb. 4. Tieftemperaturemissionsspektren von *Cyanophora paradoxa* aus der lag- (—), log- (---) bzw. stationären (- - -) Wachstumsphase einer Massenkultur (Anregungslicht 533 nm).

(Anregung bei 533 nm). Die Emission bei 640 nm ist dem Phycocyanin, die bei 663 nm dem Allophycocyanin [18], die bei 691 und 702 nm dem Photosystem II und die bei 725 nm dem Photosystem I zuzuordnen [19]. Da die Größe der Emissionssignale dem Verhältnis der Aktivitäten bei Raumtemperatur proportional sind [20], gibt die Veränderung des Emissionsspektrums die Effizienz der Energieleitung vom Phycocyanin über das Allophycocyanin und das Photosystem II zum Photosystem I wieder [18]. Offensichtlich verschiebt sich das Hauptemissionsmaximum mit zunehmender Kultivierungsdauer vom Phycocyanin in der lag-Phase zum Photosystem I in der stationären Phase, d. h. die Energieleitung wird mit fortschreitender Thylakoiddifferenzierung effizienter.

Diskussion

Insgesamt ergibt sich folgender Gesamtablauf der Thylakoiddifferenzierung in der Endocyanelle:

In Abhängigkeit vom Wachstumsstadium der Cyanophora-Massenkultur wird der Wirkungsgrad des Photosyntheseapparates effektiver (Kompensationspunkt bei niedrigeren Beleuchtungsstärken), steigt die PS I- und PS II-Aktivität, sind die Reaktionszentren beider Photosysteme von außen unzugänglicher in die Thylakoide eingebettet, verringern sich die Bindungskräfte innerhalb der Thylakoide auf das CP I, verändert sich die Zusammensetzung der Phycobilisomen, nimmt die Menge der Phycobilisomen im Vergleich zu den Chlorophyll-Protein Komplexen zu und wird der Energietransfer zwischen den Komponenten des Photosyntheseapparates effizienter.

Ähnlich wie bei freilebenden Cyanophyceen [21] reagiert *Cyanocyta korschikoffiana* in der symbiotischen Assoziation mit *Cyanophora paradoxa* auf eine Veränderung des eingestrahlten Lichtes – während der Kultivierung nimmt die effektive Lichtintensität aufgrund der steigenden Zelldichte laufend ab – sowohl mit einer drastischen Zunahme als auch mit einer wesentlich veränderten Zusammensetzung der Phycobilisomen, die bei den Cyanophyceen die Stelle des „light-harvesting-systems“ einnehmen [18]. Inwieweit diese Veränderungen und die oben aufgeführten Umorientierungen und Proteinassoziationen von „intrinsic“-Proteinen des Photosyntheseapparates, speziell des CP I, in *Cyanocyta korschikoffiana* direkt durch *Cyanophora paradoxa* beeinflusst wird, ist zur Zeit noch nicht geklärt. Erste Hinweise liegen jedoch für regulatorische Faktoren zwischen der Cryptomonade und ihren Cyanellen vor [22]. Dies würde eine Entsprechung bei *Euglena gracilis* finden, in der Regulationsmechanismen zur Thylakoiddifferenzierung zwischen Nucleocytoplasma und Chloroplasten bestehen [5–11]. Ebenso wie bei *Euglena gracilis* mit dem Anstieg des Gehalts an LHCP der Gehalt an Chlorophyll a-Protein Komplexen absinkt [8], ist auch bei *Cyanocyta korschikoffiana* ein Anstieg des Gehalts an Phycobilinen zu verzeichnen.

- [1] W. T. Hall u. G. Claus, J. Cell. Biol. **19**, 551 (1963).
- [2] R. Y. Stanier, Soc. Gen. Microbiol. **24**, 219 (1974).
- [3] A. A. Korschikoff, Arch. Russ. Protistenkunde **3**, 57 (1924).
- [4] R. K. Trench, R. R. Pool, M. Logan u. A. Engelland, Proc. R. Soc. London B. **202**, 423–443 (1978).
- [5] P. Brandt, Planta **130**, 81–83 (1976).
- [6] P. Brandt u. W. Wießner, Z. Pflanzenphysiol. **85**, 53–60 (1977).
- [7] P. Brandt, Z. Pflanzenphysiol. **94**, 299–306 (1979).
- [8] P. Brandt, Z. Pflanzenphysiol. **100**, 95–105 (1980).
- [9] P. Brandt, Ber. Dtsch. Bot. Ges. **94**, 419–434 (1981).
- [10] M. Koll, P. Brandt u. W. Wießner, Protoplasma **105**, 121–128 (1980).
- [11] F. Schuler, P. Brandt u. W. Wießner, Protoplasma **106**, 317–327 (1981).
- [12] S. Marten, P. Brandt u. W. Wießner, Ber. Dtsch. Bot. Ges. (in press) (1981).

- [13] M. Herdman u. R. Y. Stanier, FEMS Letters **1**, 7–12 (1977).
- [14] S. Bar-Nun u. I. Ohad, Plant Physiol. **59**, 161–166 (1977).
- [15] P. Brandt, Z. Pflanzenphysiol. **103**, 65–74 (1981).
- [16] G. Harnischfeger, Adv. Bot. Res. **5**, 1–53 (1978).
- [17] D. Sofrova, Z. Misurcova u. J. Hladik, Proc. 5th Internat. Congr. Photosynth., Halkidiki, Greece, p. 541 (1980).
- [18] E. Gantt, Ann. Rev. Plant Physiol. **32**, 327–347 (1981).
- [19] G. Harnischfeger u. G. A. Codd, Biochim. Biophys. Acta **502**, 507–513 (1978).
- [20] N. Murata, Biochim. Biophys. Acta **189**, 171–181 (1969).
- [21] S. Gendell, I. Ohad u. L. Bogorad, Plant Physiol. **64**, 786–790 (1979).
- [22] S. Marten, P. Brandt u. W. Wießner, Planta (in press) (1981).