Über ein Glykolipopeptid aus Chloroplasten und sein serologisches Verhalten

On a Glycolipopeptide from Chloroplasts and its Serological Properties

DORIS HIEDEMANN-VAN WYK

Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (Erwin-Baur-Institut), Köln-Vogelsang

Herrn Professor Dr. JOSEF STRAUB zum 60. Geburtstag gewidmet

(Z. Naturforsch. **26 b**, 1052—1054 [1971]; eingegangen am 8. April 1971)

Antikörper, Glykolipopeptid, Chloroplasten

The methanol-ether extract of chloroplasts contains an ether-insoluble part which after purification was classified as a glycolipopeptide. This fraction can be precipitated by the antisera to the lamellar system of chloroplasts. By immunisation of rabbits with this compound, a glycolipopeptide-antiserum was obtained. This antiserum precipitates the glycolipopeptide. There was only one precipitation line in the diffusion test. This antiserum agglutinates stroma-freed chloroplasts and precipitates the ultrasonic supernatant and the structural protein of stroma-freed chloroplasts. It must be concluded from the results of the agglutination inhibition experiments, that the reactive groups of the glycolipopeptide, in regard to the lamellar system antiserum, are the same as those of the structural protein and the supernatant of the sonicated lamellar system. The annulment of the immunoreaction after periodate treatment points to the role of carbohydrates as the determinant groups.

Wenn man aus Chloroplasten die Lipide mit einem Methanol-Äther-Gemisch extrahiert, diesen Extrakt einengt und in trockenem Äther aufnimmt, so verbleibt ein ätherunlöslicher Rückstand, der ungefähr 3% des Extraktes ausmacht¹. Dieser Rückstand läßt sich in Wasser, Methanol und Chloroform lösen. Zur Reinigung wurde das in Wasser gelöste Präparat über eine Sephadex-G-100-Säule geschickt, um niedermolekulare Verbindungen abzutrennen. Die mit der Front laufende, schwach gelb-braune Bande, die die höher molekularen Bestandteile enthält, wurde getrennt aufgefangen. Nach Einengen dieser Fraktion am Rotationsverdampfer wurde der Extrakt mit Äther ausgeschüttelt, um Reste ätherlöslicher Lipide zu entfernen. Die verbleibende wäßrige Lösung wurde entweder direkt oder nach Gefrier-trocknung zu den im Folgenden beschriebenen Versuchen verwendet.

Eine orientierende chemische Analyse ergab, daß die Substanz 13–17% Kohlenhydrate enthält. Nach saurer Hydrolyse und anschließender Silylierung² konnten durch Gaschromatographie Arabinose und Galactose als Zuckerkomponenten nachgewiesen werden. Das molare Verhältnis von Arabinose zu Galac-

tose war etwa 2 : 1. Durch den höheren Gehalt an Arabinose unterscheidet sich der Kohlenhydratanteil dieser Substanz von der Kohlenhydratzusammensetzung des lamellaren Strukturproteids³. Wenn man die Abspaltung der Zucker in Abhängigkeit von der Hydrolysendauer untersucht, so zeigt sich, daß zunächst Arabinose freigesetzt wird. Die Substanz enthält 10% Polypeptide (Folin). Der Stickstoffgehalt betrug $1,3 \pm 0,2\%$ N (Kjeldahl). Nach Hydrolyse mit 6 N HCl wurden nur die in Proteinen vorkommenden Aminosäuren gefunden. Diese liegen als Polypeptide vor, da der Circular dichroismus im fernen Ultraviolett durch einen hohen Gehalt an α -Helix bestimmt wurde. Erhitzen führt nicht zur Koagulation. Nach Behandlung mit methanolischer Salzsäure ließen sich 15% der Substanz als Fettsäuremethylester isolieren. Die Gaschromatographie der Fettsäuremethylester zeigte, daß Palmitinsäure als Hauptkomponente auftritt, gefolgt von Linolen- und Linolsäure. Das Fettsäuregemisch dieser Substanz unterscheidet sich in seiner quantitativen Zusammensetzung durch den viel geringeren Gehalt an Linolensäure deutlich von dem der ätherlöslichen Lipide aus Chloroplasten. Obwohl bei der

Sonderdruckanforderungen an Dr. DORIS HIEDEMANN-VAN WYK, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (Erwin-Baur-Institut), D-5000 Köln 30.

¹ H. NICKEL, Flora, Abt. A **159**, 233 [1968].

² C. C. SWEETLEY, R. BENTLEY, M. MAKITA u. W. W. WELLS, J. Amer. chem. Soc. **85**, 2497 [1963].

³ D. VAN WYK, Z. Naturforsch. **21 b**, 700 [1966].

Bausteinanalyse nur ungefähr 50% erfaßt wurden, konnten dem IR-Spektrum keine Hinweise auf das Vorhandensein anderer Komponenten entnommen werden. Daher wird die Substanz vorläufig als Glykolipopeptid aus Chloroplasten bezeichnet. Außer aus stromafreien Chloroplasten kann die Substanz auch aus Ultraschallfragmenten des Lamellarsystems und aus dem lamellaren Strukturprotein⁴ isoliert werden.

Es zeigte sich, daß das Glykolipopeptid durch Seren gegen das Lamellarsystem der Chloroplasten⁵ präzipitiert wird. Daher schien es interessant, seine serologischen Eigenschaften näher zu untersuchen. Hierzu war es nötig, ein spezifisches Antiserum gegen diese Substanz zu gewinnen. Nach längeren fehlgeschlagenen Versuchen führte die im methodischen Teil beschriebene Immunisierung zur Antikörperbildung in den Kaninchen. Dieses Serum präzipitierte das homologe Antigen vollständig aus seiner Lösung. Im Ouchterlony-Test sowie in der Immunelektrophorese wurde nur eine Präzipitatbande gebildet. Präparate aus den verschiedenen Ausgangsmaterialien verhielten sich gleich. Das Antiserum präzipitierte stromafreie Chloroplasten (= Lamellarsystem), mit Ultraschall fragmentiertes Lamellarsystem, den früher beschriebenen Ultraschallüberstand⁶ sowie das gelöste lamellare Strukturprotein (Abb. 1). Die ausgeführten Kreuzreaktionen sind in Tab. 1 zusammengestellt. Das Serum gegen das Glykolipopeptid präzipitiert Sulfolipid-, Phosphatidylglycerin- und Chlorophyllsuspensionen nicht. Die Seren gegen diese Verbindungen zeigen keine Reaktion mit dem Glykolipopeptid. Die früher

Abb. 1. Präzipitation von 1. Glykolipopeptid und 2. gelöstem lamellarem Strukturprotein durch a) Anti-Glykolipopeptidserum und b) Anti-Lamellarsystemserum.

Antiseren gegen	Antigene			
	Glyko- lipo- peptid	stroma- freie Chloro- plasten	Ultra- schall- Über- stand	gelöstes lamellares Struktur- protein
Glykolipo- peptid	+	+	+	+
Lamellar- system	+	+	+	+
Ultraschall- Überstand	—	+	+	—
gelöstes lamel- lares Struktur- protein	+	+	+	+

Tab. 1. Agglutinationsteste mit homologen und kreuzreagierenden Seren und Antigenen aus Chloroplasten. (Objekträger- bzw. Röhrchentest); + = Agglutination bzw. Präzipitation, — = keine Agglutination bzw. Präzipitation. Das verwendete frühe Ultraschall-Überstand-Antiserum enthält noch keine Antikörper gegen das Glykolipopeptid. Nur so läßt sich der negative Ausgang der Reaktion zwischen dem Serum und dem Glykolipopeptid sowie dem Strukturprotein-Präparat erklären. Im Ultraschall-Überstand-Präparat müssen zunächst andere Komponenten immunogen gewesen sein.

beschriebenen Seren gegen den coupling factor der Photophosphorylierung und gegen Carboxydismutase⁶ gaben keine Kreuzreaktionen.

Versetzt man Anti-Lamellarsystemseren mit steigenden Mengen des Glykolipopeptids bis kein Präzipitat mehr auftritt und titriert das so behandelte Serum mit stromafreien Chloroplasten, so kann man einen Titerrückgang von ungefähr 50% feststellen. Der Ultraschall-Überstand sowie das Strukturproteinpräparat werden durch das mit dem Glykolipopeptid vorerschöpfte Serum nicht mehr agglutiniert. Diese Agglutinationshemmversuche besagen, daß das Glykolipopeptid an der Agglutination der stromafreien Chloroplasten beteiligt ist. In den hier verwendeten Anti-Lamellarsystem-Seren konnten keine weiteren Antikörper nachgewiesen werden, die den Ultraschall-Überstand und das Strukturproteinpräparat präzipitieren. Die für diese Untersuchungen eingesetzten Anti-Lamellarsystemseren stammten übrigens alle aus der ersten Nachimmunisierungsserie. Diese Seren hatten den höchsten Agglutinationstitern in bezug auf das Glykolipopeptid und das lamellare Strukturprotein-Präparat.

Bei dem verhältnismäßig hohen Kohlenhydratgehalt lag es nahe, anzunehmen, daß an der Antigen-determinante Kohlenhydrate beteiligt sind. Abbau

⁴ P. WEBER, Z. Naturforsch. **17b**, 683 [1962].

⁵ R. BERZBORN, Dissertation, Köln 1967.

⁶ C. G. KANNANGARA, D. VAN WYK, and W. MENKE, Z. Naturforsch. **25b**, 613 [1970].

der Kohlenhydrate durch Perjodat-Oxidation⁷ führte zum Verlust der serologischen Aktivität. Auch der Ultraschall-Überstand und das lamellare Strukturproteinpräparat verloren nach einer Perjodatbehandlung ihre antigenen Eigenschaften. Aus diesem Verhalten muß auf die Mitwirkung von Kohlenhydraten in der Antigen-Antikörperreaktion geschlossen werden. Ferner kann man aus der direkten Reaktion der Glykolipopeptid-Antikörper mit dem Lamellarsystem und der Hemmbarkeit der Lamellarsystem-anti-Lamellarsystem-Reaktion durch Zugabe des Glykolipopeptids den Schluß ziehen, daß das Glykolipopeptid mit seiner Determinante an der Oberfläche der Thylakoide frei zugänglich ist.

Die Isolierung des Glykolipopeptids aus dem Lamellarsystem der Chloroplasten ist mit einer Zerstörung ihrer molekularen Struktur verbunden. Dadurch ist das Elektronentransportsystem der Thylakoidmembran so geschädigt, daß es durch Zugabe des Glykolipopeptids nicht wieder funktionsfähig gemacht werden kann. Um unter diesen Umständen Aufschluß über eine mögliche Funktion des Glykolipopeptids bei der Photosynthese zu erhalten, benötigt man ein spezifisches Antiserum.

Material und Methoden

Isolierung der stromafreien Chloroplasten: Die Chloroplasten wurden aus Blättern von *Antirrhinum majus*, Sippe 50, nach der von KREUTZ und MENKE⁸ sowie von BERZBORN⁹ angegebenen Methode isoliert. Durch Zentrifugation über einem Saccharosegradienten und anschließendem fünfmaligem Waschen mit destil-

liertem Wasser erhält man ein morphologisch intakt erscheinendes Chloroplastenpräparat.

Herstellung des Ultraschallüberstandes erfolgte nach Angaben von KANNANGARA, VAN WYK und MENKE⁶.

Darstellung des lamellaren Strukturproteids wurde nach MENKE und RUPPEL¹⁰ vorgenommen. Das in Lösung befindliche Strukturprotein wurde mit Piperidin entformyliert⁴ und dann in gelöstem oder gefriergetrocknetem Zustand für die Versuche eingesetzt.

Gewinnung von Antikörpern gegen das Glykolipopeptid: Kaninchen wurden mit einer Serie von intravenösen Injektionen folgender Zusammensetzung immunisiert: 5 mg Glykolipopeptid wurden in 1 ml 1,7% NaCl-Lösung gelöst und mit einer 0,1% methylierten Rinderserumalbumin-Lösung in dest. Wasser zusammengegeben. Dieses Gemisch wurde im Abstand von zwei Tagen injiziert. Erst nach 14 Injektionen dieser Art konnten im Serum Antikörper gegen das Glykolipopeptid festgestellt werden. Alle Immunisierungsversuche mit geringeren Mengen und ohne Zusatz von Rinderserumalbumin sowie mit Hilfe von Freund'schem Adjuvans verliefen negativ.

Bestimmung der Gesamtkohlenhydrate: Diese erfolgte kolorimetrisch mit Phenol-Schwefelsäure¹¹. Als Standard diente Glucose.

Gaschromatographie der Zucker und Fettsäuremethylester: Die Analysen wurden auf einem Argon-Gaschromatographen (W. G. Pye & Co. Ltd., Cambridge) durchgeführt. Die Zucker wurden zuvor nach der Methode von SWEELEY et al.² und VAN WYK³ in die Trimethylsilyl-Verbindungen überführt. Die Herstellung der Fettsäuremethylester erfolgte nach RADUNZ¹².

Herrn Professor Dr. W. MENKE danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit, wertvolle Diskussionen und Unterstützung. Herrn Dr. A. RADUNZ danke ich herzlich für die Bereitstellung der Lipide und Lipid-Antisera. Frau KARLA ESSMANN danke ich für gute technische Hilfe.

⁷ E. A. KABAT and M. M. MAYER, *Experim. Immunochimistry*, p. 542, Charles C. Thomas Publ., Springfield Ill. 1961.

⁸ W. KREUTZ u. W. MENKE, *Z. Naturforsch.* **15b**, 402 [1960].

⁹ R. BERZBORN, *Z. Naturforsch.* **23b**, 1096 [1968].

¹⁰ W. MENKE u. H. G. RUPPEL, in Vorbereitung.

¹¹ M. DUBOIS, K. A. GILLES, J. K. HAMILTON, P. A. REBERS, and F. SMITH, *Analytic. Chem.* **28**, 350 [1956].

¹² A. RADUNZ, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **341**, 192 [1965].