Zeitschrift: Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 83 (1973)

Heft: 1

Artikel: Über die Bindung von Mangan an Chloroplastenfragmente

Autor: Keller, Jürg H. / Bachofen, Reinhard

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-58439

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 15.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Ber. Schweiz. Bot. Ges. *83* (1), 66–74 (1973)

Über die Bindung von Mangan an Chloroplastenfragmente

von *Jürg H. Keller* und *Reinhard Bachofen*

Institut für Allgemeine Botanik
der Universität Zürich

Manuskript eingegangen am 19. Januar 1973

Wie in der vorausgehenden Arbeit dargestellt, deuten verschiedenste bisherige Befunde auf die Teilnahme von Mangan an photosynthetischen Reaktionen im Bereiche des Photosystems II des photosynthetischen Elektronentransportes. Während Park und Pon (1963) ein konstantes Chlorophyll/Mangan-Verhältnis im Grana annahmen, konnten später Neeracher et al. (1968) zeigen, dass der Mangangehalt ganzer Blätter und isolierter Grana als Funktion von Blattalter und Ernährung stark variieren kann. Es ist anzunehmen, dass Mangan in Chloroplasten in verschiedenen Formen, teilweise frei in Ionenform, so z.B. als Kofaktor von Carboxylierungen, anderseits als möglicher Elektronenüberträger des photosynthetischen Elektronentransportes aber mehr oder weniger fest an die Chloroplastenmembran gebunden vorkommen kann. Dabei stellt sich die Frage, wieweit Mangan in seiner funktionellen Form bei der Membranbiosynthese fest eingebaut wird, respektive ob das Ion auch kurzfristig eine an Mangan verarmte, inaktivierte Membran durch einfache An- oder Einlagerung reaktivieren kann, schliesslich wieweit solche Bindungsvorgänge durch den Photosynthesevorgang, respektive durch Licht beeinflusst werden.

In der vorliegenden Arbeit sollen Versuche zum Nachweis einer Licht induzierten raschen Mangan-Bindung beschrieben und Hinweise über die Art der Bindung gegeben werden.

Methodik:

Die Präparation der Chloroplastenfragmente erfolgte nach Whatley und Arnon (1963); weitere Angaben befinden sich in der vorausgehenden Arbeit (Keller und Bachofen 1973). Die Bindungsstudien wurden zu einem kleinen Teil in der dort beschriebenen Küvette,

meistens aber in einem Warburgapparat (Braun VL 85, 25 °C, Belichtungsintensität 4 mW/cm²) durchgeführt. Die Proben wurden anschliessend entweder nass verascht (90% konz. HCl und 10% konz. $HClO_4$) und dann das Mangan mittels Atomabsorption (Beckman AA-Zusatz zu DB) bestimmt oder der Einbau von ^{54}Mn (Radiochemicals Amersham) wurde durch Messung der inkorporierten γ-Aktivität (RIDL 54-7 Festkörperszintillator) verfolgt.

Resultate und Diskussion

Auf eine lichtinduzierte Bindung von Mangan an Chloroplasten kann schon aus den Versuchen über die bei Belichtung stattfindenden Potentialänderungen geschlossen werden. Wurde dort zuerst der Potentialanstieg ohne Mangan, dann derselbe nach einer Manganzugabe bestimmt, liess sich, wie vorausgehend beschrieben, die starke Stimulierung durch das Manganion zeigen. Zentrifugierte man die Chloroplasten in einem dritten Versuch nach der Belichtung in Gegenwart von Mangan sofort ab, nahm das Sediment in manganfreiem Puffer wieder auf und prüfte diese Suspension erneut auf das Redoxverhalten, so zeigten sich bei Belichtung die gleichen Potentialänderungen wie vor der Zentrifugation. Dies kann als Hinweis dafür genommen werden, dass das zugegebene Mangan vorher in genügender Menge an die Chloroplasten gebunden worden war, um auch nach dem Wechseln des Suspensionsmediums die gleichen Reaktionen an der Redoxelektrode hervorzurufen. Die Manganbindung konnte in den genannten

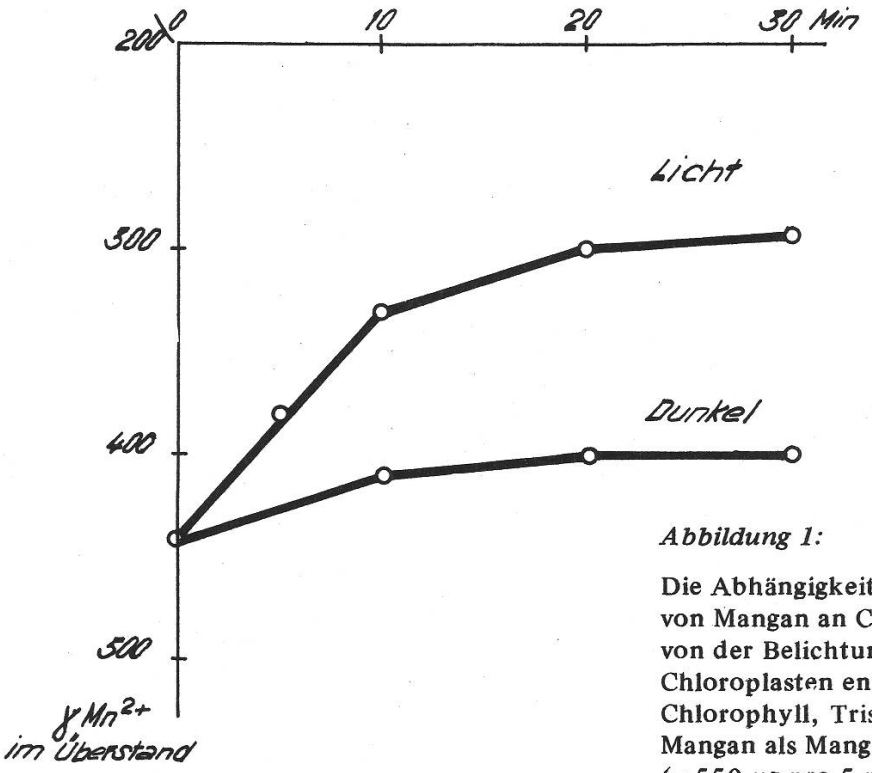

Abbildung 1:

Die Abhängigkeit der Bindung von Mangan an Chloroplastenfragmente von der Belichtung. Versuchsansatz: Chloroplasten entsprechend 1 mg Chlorophyll, Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM; Mangan als Mangansulfat 2 mM (= 550 μg pro 5 ml Reaktionsansatz); Temperatur 20 °C, Lichtintensität 4.5 mW/cm². Totalvolumen 5 ml.

Versuchen auch quantitativ nachgewiesen werden, indem sich die Abnahme des Mangangehaltes im Überstand nach nasser Veraschung direkt zeigen liess. Abb. 1 zeigt deutlich die Lichtabhängigkeit dieses Bindungsprozesses. Nach 30 Minuten scheint der Gleichgewichtszustand der Bindungsreaktion nahezu erreicht zu sein. Die Differenz zur Dunkelkontrolle beträgt dann mehr als 100 μg Mangan pro mg Chlorophyll. Von den 550 μg (= 10 μM) zugegebenen Mangans erscheinen bei sofortiger Zentrifugation im Mittel noch 450 μg im Überstand. Dass es sich dabei um eine Bindung des Metallions an die Membranfragmente handelt, zeigten auch Versuche mit ^{54}Mn, in welchen der Mangangehalt des Sedimentes gemessen wurde. Es erwies sich, dass etwa die Hälfte des Mangans, das während einer Belichtung von 30 Minuten gebunden wurde, schon unmittelbar nach dessen Zugabe fixiert wurde. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit Bakardjieva und Jordanov (1967), welche bei ihren Versuchen feststellten, dass zu Chloroplasten gegebenes Mangan unmittelbar nach der Beigabe nur noch zu 30% mit Elektronenspinresonanz nachgewiesen werden kann und sich dieser Wert innert 60 Minuten Belichtung weiter um die Hälfte verkleinert.

Während die Bindungsreaktion im Dunkeln durch die Temperatur nur wenig beeinflusst wird, zeigt die lichtinduzierte Mn-Bindung ein deutliches Optimum zwischen 25 und 30^{0}C (Abb. 2), was auch dem Optimum für lichtinduzierte Redoxänderungen entspricht (Keller und Bachofen 1973). Bezogen auf die Dunkelkontrolle fanden sich bei 5^0 nur etwa 20% der bei 25^{0}C gebundenen Manganmenge, ein Resultat, das mit Homann (1967) in guter Übereinstimmung steht.

In Abb. 3 ist die Abhängigkeit der Manganbindung von der Lichtintensität dargestellt; dabei zeigt sich ein Sättigungswert, der bei 0.8 bis 1.5 mW/cm^2 liegt. Auch dieses Ergebnis stimmt mit den entsprechenden Werten für die lichtinduzierten, manganabhängigen Redoxänderungen überein. Abb. 4 zeigt schliesslich den Einfluss verschiedener Vorbelichtungszeiten auf die Bindungsreaktion.

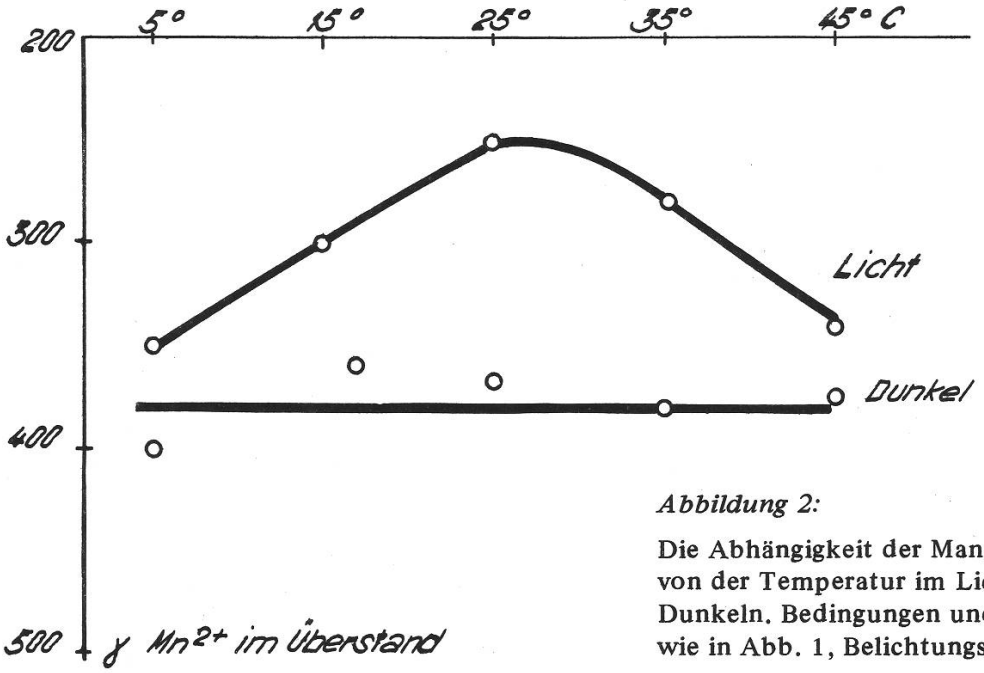

Abbildung 2:

Die Abhängigkeit der Manganbindung von der Temperatur im Licht und im Dunkeln. Bedingungen und Versuchsansatz wie in Abb. 1, Belichtungszeit 20 Min.

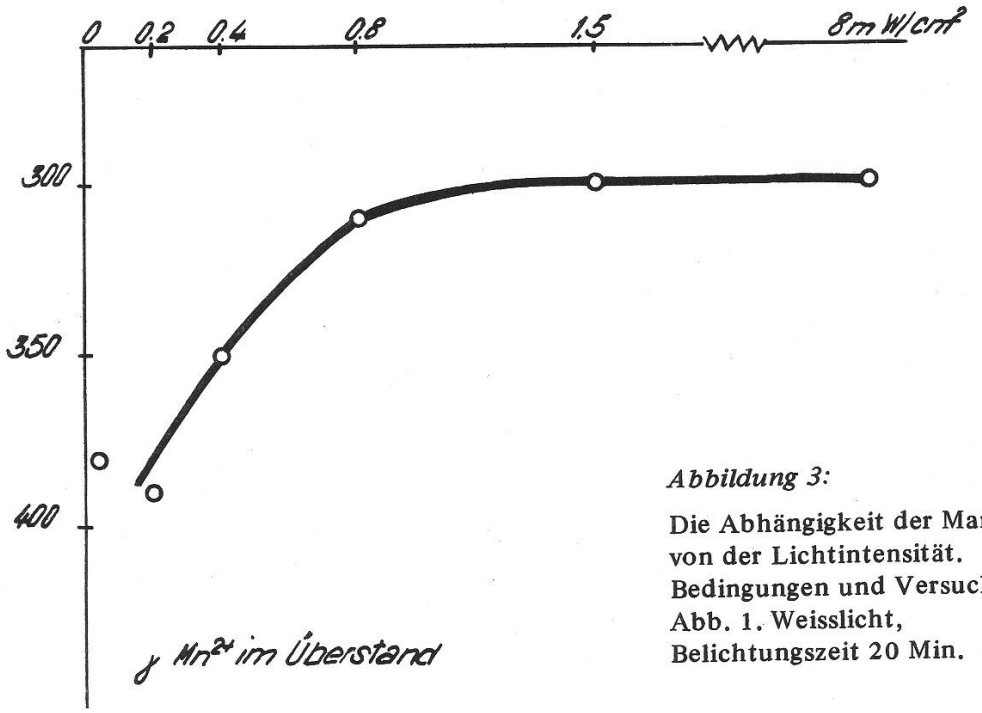

Abbildung 3:

Die Abhängigkeit der Manganbindung von der Lichtintensität. Bedingungen und Versuchsansatz wie in Abb. 1. Weisslicht, Belichtungszeit 20 Min.

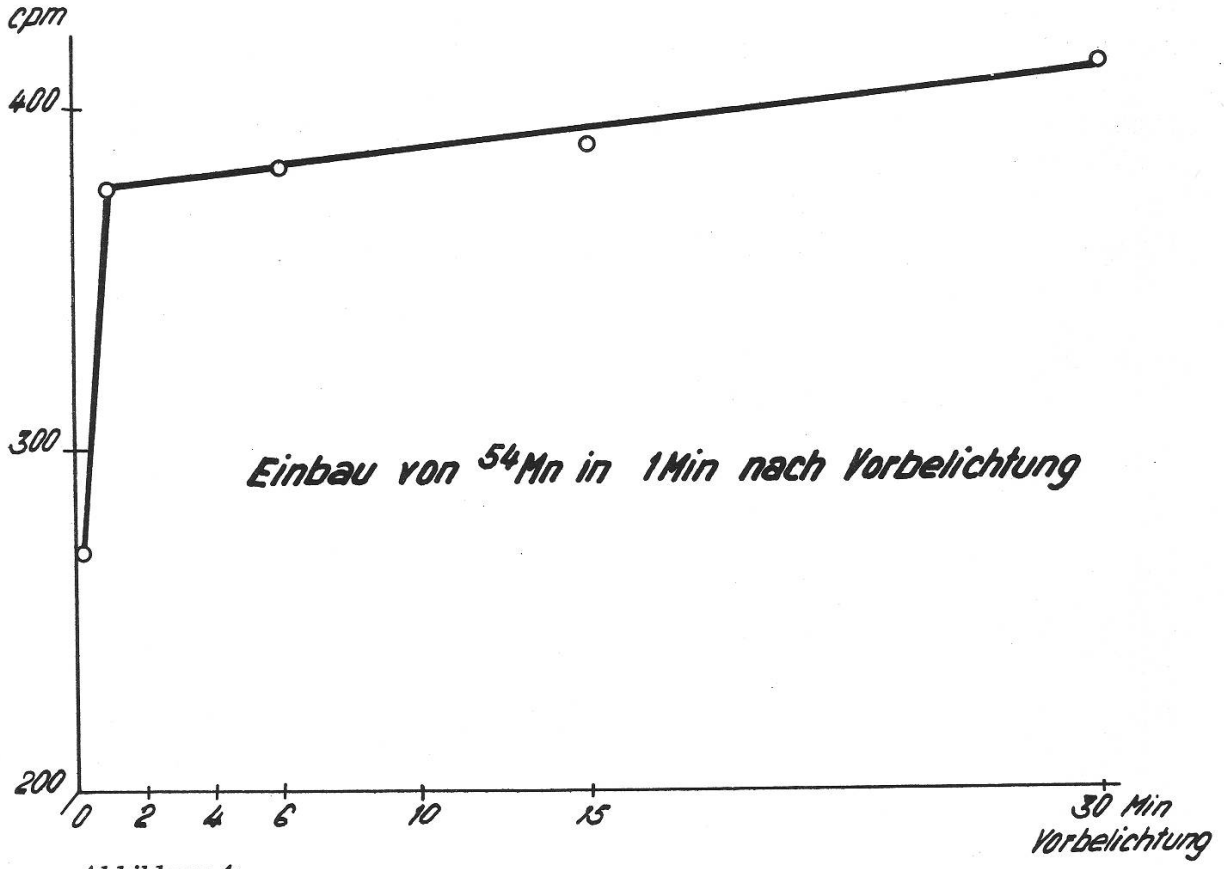

Abbildung 4:

Die Abhängigkeit der Manganbindung von der Vorbelichtung. Belichtungszeit nach Manganzugabe (^{54}Mn) 1 Min., Lichtintensität 2 mW/cm^2, übrige Bedingungen wie in Abb. 1.

Die Wirkung der Vorbelichtung ist deutlich, ihre Länge aber nur dann von starkem Einfluss, wenn sie weniger als eine Minute beträgt. Auch Donnat und Briantais (1967) konnten feststellen, dass nach Belichtungsbeginn 20 bis 60 Sekunden verstreichen, bevor die Bindung von Mangan an die Chloroplastenmembran beginnt. Es scheint, dass die für die Haftung von Mangan verantwortlichen Stellen zuerst aktiviert werden müssen. Die Vorbelichtung wirkte sich dementsprechend nur bei kurzen Belichtungszeiten in Gegenwart von ^{54}Mn auf den Bindungsvorgang aus. Wurden die Suspensionen nach der Zugabe von ^{54}Mn mehr als vier Minuten belichtet, so konnte kein Unterschied in der Grösse des gebundenen Mangans zwischen vorbelichteten respektive nicht vorbelichteten Chloroplastensuspensionen festgestellt werden.

Wie Abb. 5 zeigt, fördert die Sauerstoffbegasung die Bindungsreaktion, während diese durch Stickstoff gehemmt wird. Interessant ist, dass dabei die Bindung im Dunkeln wie im Licht in gleicher Weise gefördert beziehungsweise gehemmt wird. Der Unterschied zwischen belichteten und dunkelgehaltenen Suspensionen bleibt sich damit in allen drei untersuchten Gasphasen gleich. Damit zeigt der Vorgang der lichtinduzierten Manganbindung weitere Ähnlichkeiten zu den durch Mangan stimulierten Redoxänderungen nach Belichtung, indem die Aktivitäten unter aeroben Bedingungen durch Beschleunigung des Elektronentransportes zwar grösser sind, dass aber ein peroxidbildendes System für keinen der beiden Vorgänge eine Notwendigkeit zu sein scheint.

DCMU war bis zu einer Konzentration von 10 μM/mg Chlorophyll ganz ohne Wirkung auf den Einbau von ^{54}Mn. Dies bestätigt wiederum die Ergebnisse Homanns (1967), während Donnat und Briantais (1967) die Manganaufnahme schon bei 10^{-5} M DCMU vollständig gehemmt fanden. Homann anderseits stellte eine Hemmung des Manganeinbaues durch 2,4-Dinitrophenol fest, die jedoch Cheniae und Martin (1966) nicht bestätigen konnten. In unseren Versuchen ergab sich erst bei 10^{-3}M 2,4-DNP eine deutliche Hemmung, eine Konzentration, die

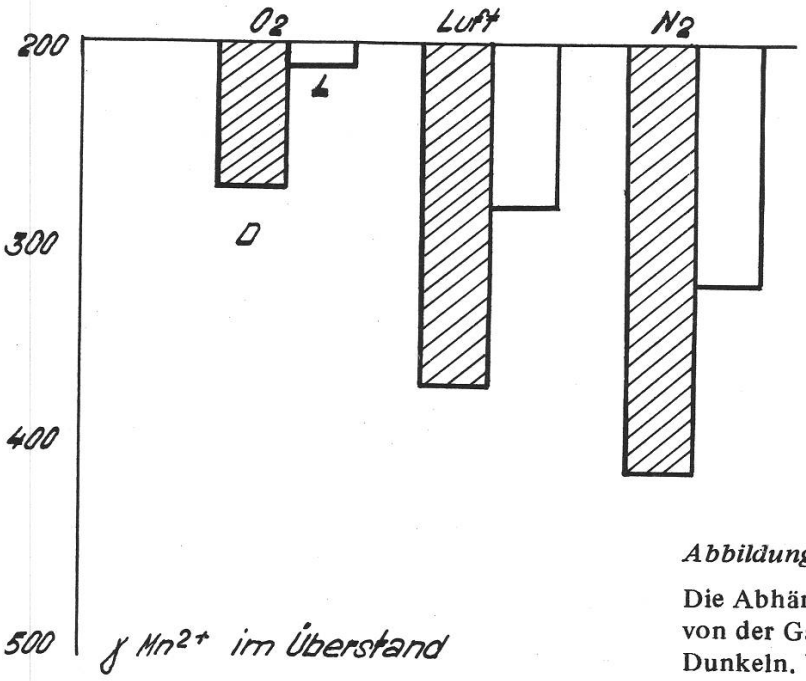

Abbildung 5:

Die Abhängigkeit der Manganbindung von der Gasphase im Licht und im Dunkeln. Versuchsansatz wie in Abb. 1.

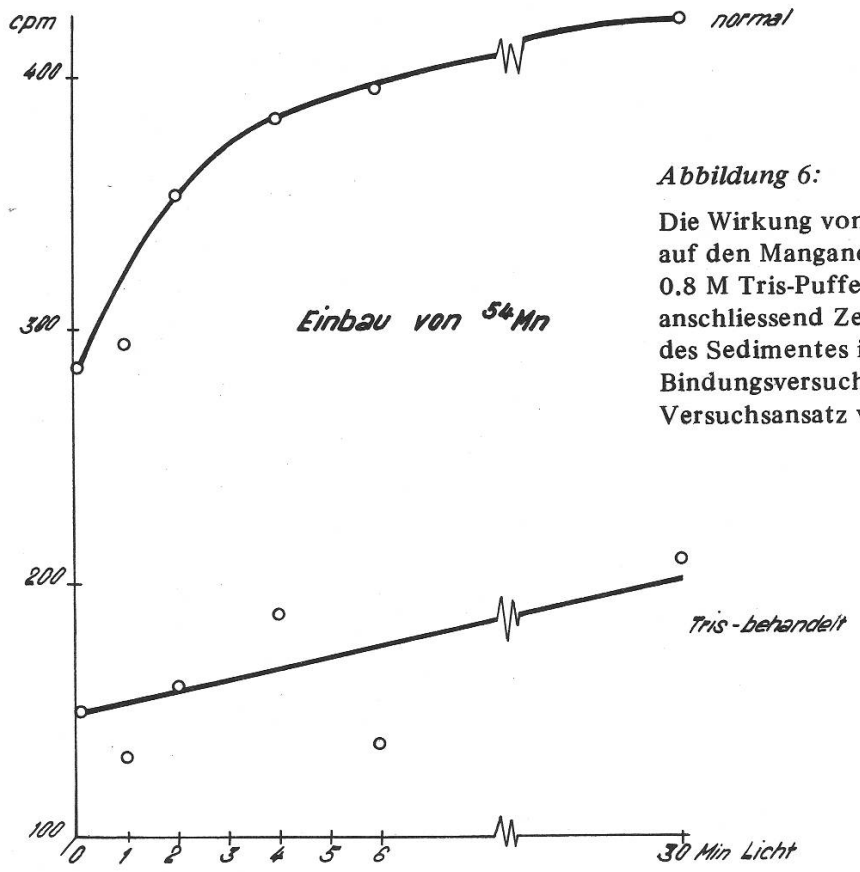

Abbildung 6:

Die Wirkung von Tris-Behandlung auf den Manganeinbau. Tris-Behandlung: 0.8 M Tris-Puffer pH 8.0, 30 Min. bei 20°C; anschliessend Zentrifugation und Aufnahme des Sedimentes in 5 mM Tris für Bindungsversuch. Bedingungen und Versuchsansatz wie Abb. 1.

denaturierend auf die Chloroplasten wirkte. Wie vor einigen Jahren nachgewiesen (Yamashita und Butler, 1968), unterbricht die Behandlung mit konzentriertem Tris-Puffer den photosynthetischen Elektronentransport zwischen dem Elektronendonator Wasser und dem Photosystem II. Auch der Einbau von Mangan wird durch diese Tris-Behandlung gestört. Nicht nur ist die sofortige Bindung von Mangan bedeutend kleiner nach der Pufferbehandlung, es wird im weiteren auch die Bindungsreaktion während der Belichtung deutlich gehemmt. Es scheint damit, dass die Einbaustelle durch die Triseinwirkung verändert wird.

Wie aus Tabelle 1 entnommen werden kann, haftet das gebundene Mangan fest an den Chloroplastenmembranen, können doch nur Harnstoff, EDTA oder tiefes pH mehr als 20% des gebundenen Mangans freisetzen. Diese Befunde entsprechen den Ergebnissen von Cheniae und Martin (1966). Das Verhalten der Bindungsreaktion bei verschiedenem pH scheint erwähnenswert: im sauren Bereich, in Bereich des isoelektrischen Punktes (pH 5.2) wird praktisch kein Mangan gebunden. Zwischen pH 6.5 und 8.0 bleibt sich die Menge des gebundenen Mangans praktisch gleich, während bei pH 8.6 doppelt so viel Mangan gebunden wird als bei pH 8.0. Im basischen Bereich bindet aber vergleichsweise auch Albumin das untersuchte Metall, vermutlich als suspendiertes Manganhydroxid. Diese Versuche zeigen, dass ein Teil der Bindungsreaktion von der Ladung der Chloroplastenfragmente abhängig ist, die naturgemäss mit dem pH-Wert der Suspension ändert. Durch Waschen mit basischen Lösungen liess sich deshalb im sauren Bereich gebundenes Mangan nicht von den Chloroplasten ablösen.

Tabelle 1

Freisetzung von im Licht während 30 Minuten gebundenem Mangan durch verschiedene Agentien und Behandlungen. Temperatur jeweils 25 °C.

Agens	Konzentration	Einwirkungsdauer	Ablösung in %
EDTA	10^{-3} M	5 Min	20
EDTA	10^{-3} M	20 Min	26
EDTA	10^{-3} M	50 Min	30
Harnstoff	2 M	20 Min	20
Cholat	1%	10	13
Deoxycholat	1%	10	15
Digitonin	1%	10	18
Lipase (Sigma)	100 ug/ml	60	14
Trypsin (Sigma)	100 ug/ml	60	20
Pankreasprotease (Sigma)	100 ug/ml	60	17
Ultraschall	–	1	17
Trismaleat-Puffer	0.05 M pH 5.2	60	25
Tris-HCl-Puffer	0.05 M pH 8.6	60	8
Aceton	90%	30	15–23

Es ist naheliegend, das gebundene Mangan in der Proteinfraktion der Chloroplasten zu vermuten. Es erstaunt daher nicht, dass Lipase nur wenig Mangan aus Chloroplasten freisetzen konnte. Während Donnat und Briantais (1967) mit Protease die gesamte Menge des gebundenen Mangans in Lösung bringen konnten, war dieses Enzym in unseren Versuchen nur schwach wirksam. Während einer 30 Minuten dauernden Extraktion mit Aceton liessen sich 15–20% des gebundenen Mangans von den Partikeln lösen. Eine längere Behandlung veränderte diese Werte nur noch geringfügig. Es kann daraus mindestens geschlossen werden, dass Mangan nicht an die Pigmentlipide gebunden wird, was wiederum mit den Resultaten von Cheniae und Martin übereinstimmt (1966).

Anschliessend an die Acetonextraktion wurde das dabei gefällte Protein während 24 h bei 5 °C gegen 0.02 M Tris (pH 7.0) dialysiert. Dabei zeigte sich, dass bei geringen Konzentrationen an Mangan während des Bindungsvorganges (2.10^{-14} M) jenes sowohl durch Dialyse wie auch durch Waschung mit Puffern vollständig ausgewaschen werden kann. Wurde jedoch der Bindungsvorgang bei höheren Mangankonzentrationen durchgeführt (10^{-3} M, bei gleicher Chloroplastenkonzentration), ergab die 24stündige Dialyse nur einen Verlust von 35–40% des gebundenen Mangans, eine anschliessende Waschung mit Puffer konnte diesen Wert nicht mehr weiter vergrössern.

Der Bindungsvorgang von Mangan an Chloroplastenfragmente lässt sich damit in zwei Einzelvorgänge gliedern. a) Mangan lagert sich, vermutlich unphysiologisch durch elektrostatische Kräfte, an den Chloroplastenfragmenten an. Dieser Vorgang scheint verantwortlich zu sein für das im Dunkeln gebundene Mangan, durch Waschung und Dialyse ist dieses Mangan relativ leicht von der Membran zu entfernen. b) Das so angelagerte Mangan diffundiert zur Mangan-Bindungsstelle, wo es physiologisch aktiv wird. Diese Reaktion ist licht- und temperatur-

abhängig und somit verantwortlich für das bei Belichtung gebundene Metallion. Das mit der Membran assoziierte Metall lässt sich unter physiologischen Bedinungen nur schwer ablösen. Mittels drastischer Methoden kann Mangan aber, unter Denaturierung der Membranproteine, wieder freigesetzt werden (Zakharova et al. 1967).

Der lichtabhängige Bindungsvorgang zeigt eine ähnliche Abhängigkeit von Aussenfaktoren wie die früher beschriebene Manganoxydation (Bachofen 1966) oder die lichtinduzierten Potentialänderungen in der Anwesenheit von Mangan (Keller und Bachofen 1973), es ist daher zu vermuten, dass die drei Reaktionen in enger Beziehung zueinander stehen. Allerdings unterscheiden sie sich kinetisch deutlich. Während für Potentialänderungen und die Oxydation die Wirkung des zugegebenen Mangans sofort sichtbar ist und im folgenden die Reaktionsrate nur noch wenig zunimmt, erstreckt sich der Einbau von Mangan über mindestens 30 Minuten. Mangan^{2+}Ionen der umgebenden Lösung können damit ohne Verzögerung mit dem endogen gebundenen Mangan des Elektronentransportes reagieren, durch eine gleichzeitig ablaufende Bindung des Ions an derselben Stelle werden die ersten Vorgänge weiter stimuliert.

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds für die grosszügige Unterstützung.

Zusammenfassung

In einer ersten temperatur- und lichtunabhängigen Reaktion bindet Mangan durch Ionenaustausch an die Chloroplastenmembran. Das so fixierte Mangan kann leicht wieder abgelöst werden. In einer zweiten, eigentlichen Bindungsreaktion erfolgt der stabile Einbau in die Membranstruktur. Dieser Vorgang ist abhängig vom Licht und von der Temperatur, er benötigt eine Aktivierung der Manganbindungsstelle. DCMU und DNP vermögen die lichtinduzierte Manganbindung nicht zu hemmen, dagegen blockiert eine Behandlung mit konzentrierter Tris-Lösung nicht nur den Elektronentransport vor dem Photosystem II, sondern reduziert auch den Einbau von Mangan in die Chloroplastenmembran. Das im Licht fixierte Mangan kann durch Komplexbildner, Detergentien und membranzerstörende Enzyme nur zu einem kleinen Teil aus der Membran solubilisiert werden.

Summary

The Binding of Manganese to Chloroplast Fragments.

The binding of manganese to chloroplast membranes occurs in two distinct reactions. In the first step, independant of temperature and light, the manganese is attached to the membranes by ion-exchange. In this state the metal ion is easy removable from the membrane. In the second reaction the metal is incorporated into the membrane in a reaction sensitive to temperature and induced by light. The binding site for manganese has to be activated before binding. DCMU and DNP do not inhibit the lightinduced binding of the manganese, but treatments with concentrated Tris solutions reduce the amount of bound manganese to the chloroplasts. This stably bound manganese can only be removed from the membranes to a small extent by non denaturing concentrations of detergents, chelating agents or enzymes acting on the membrane structure.

Literatur

Bachofen R. 1966. Die Oxydation von Mangan durch Chloroplasten im Licht. Zeitschr. f. Naturforschung 21 b, 278.

Bakardjieva N., N. Jordanov, 1967. ESR studies on photoinduced changes in Mn^{2+}-content in plant tissuses and isolated chloroplasts. Compt. rend. Acad. bulg. Sci. 20, 719.

Cheniae G.M., I.F. Martin, 1966. Studies on the function of manganese in photosynthesis. Brookhaven symposium 19, 409.

Donnat P., J.M. Briantais, 1967. Variation du tau de manganese induite par la lumière dans l'appareil photosynthetique. Compt. rend. Acac. Sci. Paris 165, D-21.

Homann P.M. 1967. Studies on the manganese of the chloroplasts. Plant Physiol. 42, 997.

Keller J.H. 1969. Reaktionen gebrochener Spinat-Chloroplasten mit Mn^{2+}. Dissertation Zürich.

Keller J., R. Bachofen. 1973. Über lichtinduzierte Redoxpotentialänderungen in Chloroplastensuspensionen in Anwesenheit von Manganionen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. 82, 350.

Neeracher H., I. Specht-Jürgensen. R. Bachofen, 1968. Untersuchung über die Manganverteilung zwischen Zellfraktionen aus Spinatblättern und ihr Zusammenhang mit dem Manganhaushalt. Planta (Berlin) 79, 235.

Park R.B., N.G. Pon, 1963. Chemical Composition and the structure of lamellae isolated from Spinacea oleracea chloroplasts. J. Molec. Biol. (Lond.) 6, 105–114.

Whatley F.R., D.I. Arnon, 1963. In Colowick and Kaplan eds. Methods in Enzymology VI, 309.

Yamashita T., W.L. Butler, 1968. In Shibata et al. (eds.) Comparative Biochemistry and Biophysics of photosyntheses, p. 179. Univ Tokyo Press.

Zakharova N.I., Zh.I. Nemtseva, V.M. Kutyurin, 1967. Stably bound manganese in chloroplasts. Plant physiology (USSR) 14, 628.