Bakteriochlorophyllvorstufen und Pigment-Protein-Komplexe in *Rhodospirillum rubrum* ST3 und GN11

DIPLOMARBEIT

vorgelegt von **Jörg U. Hammel** Matrikelnummer: 1966716

durchgeführt am Biologischen Institut Abteilung Bioenergetik Universität Stuttgart



Gutachter: Prof. Dr. R. Ghosh Prof. Dr. U. Kull

Stuttgart, Oktober 2006

Bakteriochlorophyllprecursors and pigment-protein-complexes in *Rhodospirillum rubrum* ST3 and GN11

DIPLOMARBEIT

vorgelegt von **Jörg U. Hammel** Matrikelnummer: 1966716

durchgeführt am Biologischen Institut Abteilung Bioenergetik Universität Stuttgart



Gutachter: Prof. Dr. R. Ghosh Prof. Dr. U. Kull

Stuttgart, Oktober 2006

Hiermit versichere ich, diese Arbeit selbstständig durchgeführt zu haben. Durch die Hilfe Dritter erhaltene Resultate sind als solche gekennzeichnet. Alle verwendeten Quellen sind im Literaturverzeichnis aufgeführt.

Stuttgart-Vaihingen, den 5. Oktober 2006

Jörg U. Hammel

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	II
2. Abkürzungen	III
3. Einleitung	1
4. Material und Methoden	7
4.1 Chemikalien	7
4.2 Kultivierung von <i>R. rubrum</i>	7
4.3 Zellernte	8
4.4. Isolation von Chromatophoren (intrazytoplasmatische Membranen, ICM)	9
4.5 Isolation von Proteinkomplexen aus Chromatophoren	11
4.6 Isolation von Bakteriochlorophyllvorstufen	11
4.6.1 Reinigung von BChl-Vorstufen aus Kulturüberständen von M- und M2SF+-	
Medien	13
4.6.2 Isolation der an ST3/ GN11 Chromatophoren gebundenen BChl-Vorstufen	13
4.7 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry-Peterson	14
4.8 SDS-PAGE	
4 8 1 Proteinfällung für die SDS-PAGE	15
4 8 2 Probenvorbereitung für die SDS-PAGE	16
4 8 3 Silberfärbung	16
4 8 4 Coomassie Färbung	17
4 8 5 Hämfärbung	18
4 9 LIV/VIS-Snektroskonie	18
4 10 Fluoreszenzsnektroskonie	19
4 11 Circulardichroismus (CD)	10
4 12 Massensnektroskonie	20
4 13 Dünnschichtchromatographie (DC)	20
4.14 Normal-Phasen-Flüssigkeits-Chromatographie	20
4.15 Hoch_Druck_Elüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	21
4.16 Komplementations Assay isolierter Proteinkompleye	22
4.17 Elektronenmikroskonie gereinigter Protein-Pigmentkompleye	25
4.17 Elektronenmikroskopie gereinigter i fotein-rightentkomplexe	2 न 24
5. Ergebnisse	27
5. Ergebrilsse	25
5.1 Wachstumstumer von Breteinkompleven aus <i>B. ruhrum</i> ST2 und CN11 ICMs	20
5.2 Charaktensierung von Proteinkomplexen aus R. <i>Tubrum</i> 515 und GNTTTOMS	30
5.2.1 Komplementations-Assay Isolienter Proteinkomplexe	
5.3 Charaktensierung der Baktenochlorophylivorstulen	30 20
5.3.1 Dakteriochlorophyllvorstufen von Chromotonhoron	30
5.3.2 Bakteriochiorophylivorsturen von Chromatophoren	47
5.3.3 Massenspektroskopie	52
/. Keierenzen	64
8. Annang	70
Danksagung	73

1. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Mutanten des α-Proteobakteriums Rhodospirillum rubrum untersucht, die im Bakteriochlorophyll-Biosyntheseweg unterbrochen sind, um einen Beitrag zum genaueren Verständnis der Biosynthese dieser Moleküle und der einzelnen daran beteiligten Schritte zu liefern. Von den beiden Stämmen ST3 und GN11 wurden die ins Kulturmedium ausgeschiedenen Pigmente aufgereinigt und spektroskopisch analysiert. Ebenfalls wurden sowohl von ST3, als auch von GN11 die in intracytoplasmatischen Membranen gebundenen Pigmente extrahiert und aufgereinigt. Anhand der ermittelten und chromatographischen Eigenschaften spektroskopischen der isolierten Pigmente konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei denen ins Kulturmedium ausgeschiedenen und in intracytoplasmatischen Membranen gebundenen Pigmenten um dieselben Bakteriochlorophyllvorstufen handelt. Die im ST3-Stamm angehäuften Vorstufen P660 und P667 (benannt nach dem langwelligsten Absorptionsmaximum) konnten als 2-Devinyl-2- α -hydroxyethyl-phaeophorbid a und Phaeophorbid a bestimmt werden. Bei denen im GN11-Stamm angehäuften Vorstufen handelt es sich um ein Gemisch verschiedener Vorstufen in dem mit Sicherheit Magnesium 2,4 – Divinylphaeoporphyrin a₅ Monomethylester als eine Komponente enthalten ist.

Von beiden Stämmen wurden Pigment-Proteinkomplexe aus intracytoplasmatischen Membranen isoliert. Die gewonnen Pigment-Proteinkomplexe zeigen Absorptionsspektren, die in Übereinstimmung sind mit Spektren ganzer Zellen und in beiden Fällen ein deutliches CD-Signal aufweisen. Die Komplexe enthalten neun Proteine unterschiedlicher Größe, für die keine eindeutige Zuordnung getroffen werden konnte. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der isolierten Pigment-Proteinkomplexe vom ST3-Stamm zeigen partikuläre, ringförmige Strukturen. Sie neigen zur Aggregation und bilden unter diesen Umständen fädige und runde Formen aus.

2. Abkürzungen

20T8	20 mM TrisHCl pH 8,0
2D-DC	2-Dimensionale Dünnschichtchromatographie
ALA	5-Aminolaevulinsäure
APS	Ammoniumpersulfat
BChl	Bakteriochlorophyll
BPh	Bakteriophaeophytin
BSA	Bovines Serumalbumin
Chl	Chlorophyll
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DHPC	1,2-Diheptanoyl- <i>sn</i> -phosphatidylcholine
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
HAc	Essigsäure
HCI	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N-2-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HAT	Hochspannung
ICM	Intracytoplasmatischemembran
LH1/ 2	Lichtsammelkomplex 1/ 2
LDAO	Lauryldimethylaminoxid
MeOH	Methanol
NaOAc	Natriumacetat
Na-P	Natriumphosphat
NH ₄ -Succinat	Ammoniumsuccinat
OD ₄₄₅	Optische Dichte bei 445 nm
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP-Geranylgeranyl	Geranylgeranyl-Pyrophosphat
PPi	Pyrophosphat
PrOH	Propanol
Q _A / Q _B	Quinon (A bzw. B)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-polyacrylamid-gelelectrophorese
TCA	Trichloressigsäure
TMBZ	Tetramethylbenzidin
TMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
UpM	Umdrehungen pro Minute
UZ	Ultrazentrifuge

3. Einleitung

Die Fähigkeit, Licht als Energieguelle zum Wachstum zu nutzen, ist zwei Gruppen von Bakterien eigen. Beide unterscheiden sich grundlegend. Die Purpurbakterien und grünen phototrophen Bakterien kann man als Relikte aus der Frühzeit der Evolution der Photosynthese ansehen. Sie können nicht wie Pflanzen Wasser als Wasserstoff-Donator verwerten, sondern sind auf stärker reduzierte Wasserstoff-Donatoren angewiesen. Folglich entwickeln diese Bakterien während der Photosynthese auch keinen Sauerstoff. Sie betreiben eine anoxygene Photosynthese. Ihre auffallende Farbe wird durch die Photopigmente, Bakteriochlorophylle und Karotinoide, verursacht. Im Gegensatz dazu verwerten Cyanobakterien Wasser als Wasserstoff-Donator und entwickeln im Licht Sauerstoff. Sie betreiben eine oxgene Photosynthese. Das Pigmentsystem umfasst Chlorophyll a, Karotenoide und Phycobiline. Ihr Prozess der Photosynthese gleicht grundsätzlich dem der Pflanzen. Die phototrophen Bakterien, die eine anoxygene Photosynthese betreiben. werden in drei große Gruppen unterteilt: Schwefelpurpurbakterien, schwefelfreie Purpurbakterien und grüne Schwefelbakterien. Diese drei Gruppen unterscheiden sich wesentlich durch ihre cytologischen und physiologischen Eigenschaften, sowie durch ihre Pigmente voneinander. Im Gegensatz zu den grünen Schwefelbakterien, in denen die Bakteriochlorophylle (BChl) a, c, d und e vorkommen, sind in Purpurbakterien nur BChl a und BChl b zu finden. *Rhodospirillum rubrum* als ein α -Proteobakterium aus der Gruppe der Rhodospirillaceae gehört zu den gram-negativen, schwefelfreien Purpurbakterien. Diese Bakterien weisen eine extreme Stoffwechselvielfalt auf. Sie sind fakultativ anaerobe Bakterien und in der Lage, anaerob im Licht (photosynthetisch), aerob im Dunkeln durch oxidative Phosphorylierung und unter anaeroben Bedingungen fermentativ zu wachsen.

Die Möglichkeit nicht-photosynthetisch zu wachsen, ermöglicht es Mutanten, die in der Photosynthese beeinträchtigt oder blockiert sind, zu untersuchen. Das photosynthetische Wachstum der Bakterien ist abhängig von der Synthese eines spezialisierten intracytoplasmatischen Membransystems (ICM) (Oelze & Drews, 1972), das aufgrund eines Absinkens des äußeren Sauerstoffpartialdrucks induziert wird (Cohen-Bazire & Kunisawa, 1960; Drews *et al.*, 1969; Oelze *et al.*, 1969; Schick & Drews, 1969; Oelze, 1976). In diesem Membransystem befinden sich die Kernkomponenten des photosynthetischen Apparats, der sich in der Regel aus vier membrangebundenen Proteinkomplexen sowie einem ATPase-Komplex, der die produzierte protonenmotorische Kraft für die Synthese von ATP nutzt, zusammensetzt. Das Reaktionszentrum sowie die Lichtsammelkomplexe 1 und 2 stellen die drei für die Photosynthese spezifischen Protein-Pigmentkomplexe dar. Der Cytochrom-bc₁-Komplex ist im Elektronentransport der Atmungskette wie auch der Photosynthese beteiligt. *R. rubrum* wie auch *Rhodobacter viridis* besitzt nur einen einzigen Lichtsammelkomplex, den LH1-Komplex.

Der Elektronenfluss im bakteriellen Photosystem wird angeregt, wenn von den Lichtsammelkomplexen Lichtenergie absorbiert und als Exciton auf das "special pair" der BChl a Moleküle (BChla) im Reaktionszentrum übertragen wird. Dies hebt ein Elektron im besonderen Paar in einen angeregten Zustand, welches Bakteriophaeophytin-Molekül (BPh) im Reaktionszentrum schnell auf ein übertragen wird, um dieses zu reduzieren. Dieser Elektronentransferprozess hinterlässt eine positive Ladung im "special pair", die durch ein Elektron eines reduzierten Cytochrom c₂ Moleküls von der periplasmatischen Seite der bakteriellen photosynthetischen Membran ausgeglichen wird. Der Kreislauf setzt sich fort, indem ein Elektron des reduzierten BPh Moleküls auf ein benachbartes Quinon (Q_A) übertragen wird. Wenn das Elektron von Q_A an ein Q_B Molekül übergeben wird, entsteht ein Semiguinon-Radikal. Der Fluss eines zweiten Elektrons zu Q_B, durch weitere Absorption von Lichtenergie, ist nötig, um zusammen mit zwei Protonen aus dem Cytosol das vollständig reduzierte Quinon QH₂ zu bilden. Schließlich wird das reduzierte QH₂ in einen Ubiquinon-Pool entlassen, der Elektronen zum Cytochrombc1-Oxidoreduktase-Komplex transportiert. Auf diese Weise kann durch den zyklischen Elektronenfluss und die entstandene protonenmotorische Kraft durch die ATPase Lichtenergie in speicherbare chemische Energie umgewandelt werden.

Neben seiner Rolle als primäres Pigment der Photosynthese ist der Einbau von Bakteriochlorophyll (BChl) in Pigment-Proteinkomplexe des photosynthetischen Apparates essentiell für die Ausbildung der ICMs (Cohen-Bazire & Kunisawa, 1963; Schick & Drews, 1969). Studien mit Mutanten, die in der Biosynthese von BChl blockiert waren (Jones, 1963a, 1963b, 1963c; 1964; Lascelles, 1966; Lascelles & Altshuler, 1967; Richards & Lascelles, 1969; Oelze & Drews, 1970; Pudek & Richards, 1975; Pradel & Clement Metral, 1976; Yang & Bauer, 1990; Burke et al., 1993a; Bollivar et al., 1994; Suzuki & Bauer, 1995; Addlesee & Hunter, 2002), zeigen, bei Bedingungen mit niedrigem Sauerstoffniveau zur Induktion der Bildung des photosynthetischen Apparates, niedrige stationäre Niveaus der Apoproteine der Reaktionszentren und Lichtsammelkomplexe. Weiterhin sind diese Mutanten unter niedrigem Sauerstoffpartialdruck in der Anhäufung von Karotenoiden beeinträchtig. Dies weist darauf hin, dass die Produktion von BChl für das Zusammenfügen und die richtige Insertion vieler Komponenten des photosynthetischen Apparates notwendig ist. Aufgrund dieser essentiellen Rolle können Studien der BChl-Biosynthese und Regulation dazu beitragen, das Gesamtverständnis der Biogenese des photosynthetischen Apparates besser zu verstehen.

Die Synthese und Assemblierung der photosynthetischen intracytoplasmatischen Membranen von *R. rubrum* werden durch ein Umschalten von aerober Atmung auf photoheterotrophes Wachstum induziert (Cohen-Bazire & Kunisawa, 1963; Marrs & Gest, 1973; Bauer & Bird, 1996). In diesem Fall wird *R. rubrum* unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln BChla anhäufen, sofern ein alternativer Elektronenakzeptor angeboten wird.

Die oxygene Photosynthese, bei der Chlorophyll a/b (Chl) als primäres Photopigment verwendet wird, ist bei höheren Pflanzen und Algen in den Chloroplasten sowie bei Cyanobakterien zu finden. Bei der anoxygenen Photosynthese der Eubakterien wird eine Vielzahl ähnlicher Pigmente genutzt, die als BChl a-g bezeichnet werden. Im Vergleich zu den BChl sind die Chlorophylle (Chl) weniger reduziert. Die frühen Schritte in der BChl-Synthese der Purpurbakterien werden auch bei der Synthese des Haems genutzt. Ausgehend von der Vorstufe 5-Aminolaevulinsäure (ALA) werden durch sechs auf einander folgende Enzymreaktionen acht ALAs zusammengefügt und bilden Protoporphyrin IX (Leeper, 1989). Der Syntheseweg verzweigt sich dann in die Haem-Biosynthese, die durch die Insertion von Fe²⁺ in Protoporphyrin IX durch die Ferrochelatase vollzogen wird, während der BChl-Biosyntheseweg die Insertion von Mg²⁺ durch die Mg-Protoporphyrin-IX-Chelatase (BchDIH) erfordert. In zehn weiteren enzymkatalysierten Schritten entsteht dann das Endprodukt BChl (Abb. 1). Die Enzyme des Mg-Zweiges werden durch die bch Gene kodiert. Eine Zuordnung gelang zunächst mit Hilfe der von Mutanten angehäuften BChl-Vorstufen und konnte im Weiteren durch Homologieanalysen gestützt werden (Kaplan, 2002; Raymond et al., 2002). Allerdings fehlen bis heute für einige der Schritte noch immer spezifische Enzymassays. Das erste photosynthetische Gen eines Bakteriums wurde von Zsebo & Hearst (1984) in Rhodobacter capsulatus beschrieben. Einige der photosynthetischen Gene, unter anderem die Gene des Mg-Zweiges der BChl-Biosynthese, sind bei Rb. capsulatus und Rb. sphaeroides in einem kleinen Abschnitt des Genoms enthalten, der als photosynthetisches Gencluster bezeichnet wird (Abb. 2). Dieser enthält auch die Gene, die die Proteine des Reaktionszentrums und des Lichtsammelkomplexes kodieren. Einige dieser Pigment-Biosynthese-Operons sind als Superoperons organisiert. Wellington et al. (1992) konnten Superoperon-Aktivität für das bchFNBHLM Operon zeigen. Die crtEF-, bchCXYZ- und pufQBALMX-Operons in Rb. capsulatus sind ebenfalls als Superoperons organisiert. Wellington et al. (1991) zeigten, dass jedes der Operons ausgehend von seinem eigenen Promotor exprimiert werden kann, aber ebenfalls eine "read-through"-Transkription über alle Operons ausgehend von crtEF möglich ist. In R. rubrum, wie auch in einigen weiteren phototrophen Mikroorganismen ist die Organisation der Pigment-Biosynthese-Operons in Form von Superoperons zu finden, jedoch finden sich hier die einzelnen Superoperons nicht gemeinsam in einem kleinen konservierten Genomabschnitt, der als photosynthetisches-Gen-

Mg SAH Mg Protoporphyrin IX Chelatase SAM Mg Protoporphyrin Methyl Transferase *bchM* Mg Protoporphyrin IX Monomethylester Oxidatve Cyclase behD, behl, beh H н₂с фц СССН CON Mg-Protoporphyrin-Monomethylester Mg-Protoporphyrin IX **Protoporphyrin IX** bchE +Fe²⁺ Protoheme bchE Mg 2,4-Divinylphaeoporphyrin a5 Monomethylester + 2H bch. 2-Desvinyl-2-Hydroxyethyl Chlorophyllid a нора Monovinyl-Proto-chlorophyllid a bchX, bchY, bchZ bchF bchL, bchN, bchB 2-Vinyl-Bakteriochloro phyllid Hydratase Protochlorophyllid Reduktase + 2H ٧ H₂C 2-Vinyl-Bakteriochloro phyllid Hydratase Chlorophyll-synthetase hchE Chlorophyll a + H₂(2-Desacetyl-2-Hydroxyethyl -Bakteriochlorophyllid a Chlorophyllid a bchX, bchY, bchZ bchC CODCH. 2-α-Hydroxyethyl-bakteriochlorophyllid Dehydrogenase - 2H 2-Desacetyl-2-Vinyl Bakteriochlorophyllid ньс PP + 2H bchP eranylgeranyl Bakteric chlorophyll Reduktase PP-Granylgeranyl bchG eranylgeranyl Bakterio chlorophyll Synthase СН Bakteriochlorophyllid a Geranylgeranyl-Bakteriochlorophyll a Bakteriochlorophyll a_{DHGG}

cluster bezeichnet werden kann und alle Superoperons enthält, sondern teilen sich in drei konservierte Superoperons, die sich in einigen Fällen beinahe über die

Abb. 1: Biosyntheseweg von Bakteriochlorophyll ausgehend von Protoporphyrin IX



Abb. 2: "Photosynthetisches Gencluster" von *R. rubrum* mit dem in das im ST3-Stamm im *bchX* Gen eingefügte Tn5-Element (Sägesser, 1992; KEGG, 1995-2006; Ghosh, unveröffentlichte Daten). Das Tn5-Element enthält Resistenzgene für Kanamycin, Bleomycin und Streptomycin (Beck *et al.*, 1982; Mazodier *et al.*, 1985). Die *bchY* Sequenz ist nicht vollständig gesichert (grau eingerahmt).

ganze Länge des Genoms verteilen. In einem System, in dem die Balance zwischen der Produktion von BChl und Apoproteinen essentiell ist, stellt die Organisation in Superoperons einen wirkungsvollen Mechanismus der Regulation dar. Die Superoperon "read-through"-Transkription erlaubt eine direkte Transkriptionskontrolle der Produktion von BChl und Strukturpolypetiden.

Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stämmen von R. rubrum handelt es sich um Mutanten, die in der Biosynthese von BChl blockiert sind. Der Stamm GN11 wurde von Sägesser (1992) einer bchB Mutante zugeordnet. Neuere Untersuchungen anhand von Komplementationsexperimenten mit Plasmiden, die BCh-Synthese-Gene enthalten, deuten darauf hin, dass es sich bei GN11 nicht um eine bchB Mutante handelt, sondern diese Mutante sehr wahrscheinlich eine Punktmutation, die vermutlich im bchJ Gen (4-Vinyl-Reduktase) lokalisiert ist, enthält (Ghosh, unveröffentlichte Daten). Die 4-Vinyl-Reduktase reduziert den Mg-2,4-Divinylphaeoporphyrin-a₅-Monomethylester zu Monovinyl-Protochlorophyllid-a. Diese Reduktion ist zum Teil nicht vollständig, so dass ein gemischter Pool an Monovinyl- und Divinyl-Intermediaten resultiert. Eine Reihe von Untersuchungen hat gezeigt, dass sich Protochlorophyllid und Chlorophyllid in variierenden Monovinyl/Divinyl-Verhältnissen finden, die von den untersuchten Organismen, Umweltbedingungen oder bei Pflanzen vom Alter abhängen (Suzuki & Bauer, 1995). Die Bedeutung dieser Beobachtungen ist bisher unbekannt. Der gemischte Pool an Monovinyl- und Divinyl-Intermediaten weist entweder auf ein einzelnes Enzym mit verminderter Substratspezifität oder auf mehrere 4-Vinyl-Reduktasen

hin, die für die Reduktion der 4-Vinyl Gruppe unterschiedlicher Intermediate verantwortlich sind. Eine abschließende Klärung dieser Fragestellung und des genauen Weges der Reduktion der 4-Vinyl-Gruppe in *R. rubrum* ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch offen.

Die zweite verwendete Mutante, der Stamm ST3 (Sägesser, 1992), besitzt eine Insertion eines Tn5-Elements, welches eine Kanamycinkassette im bchCXYZ Operon enthält. Die Genprodukte von bchXYZ kodieren für die Chlorophyllid Reduktase, die den Ring II des Pyrroles reduziert, um die Produktion von Bakteriochlorophyll a zu ermöglichen. Die Proteinsequenzen von BchX, BchY und BchZ weisen Homologien mit den Sequenzen der BchL-, BchN- und BchB-Untereinheiten der lichtunabhängigen Protochlorophyllid-Reduktase auf (Burke et al., 1993c). Dies lässt vermuten, dass die Reduktion vermutlich durch einen vergleichbaren Mechanismus erreicht wird. Vermutlich dienen BchX bzw. BchL als Elektronendonor für die katalytischen Untereinheiten BchY-Z bzw. BchN-B. BchN-B und BchY-Z sind vermutlich für die spezifische Reduktion unterschiedliche Stellen des Tetrapyrrolringes (Ring IV gegenüber Ring II) verantwortlich. Die Reduktion des Ring II kann entweder vor oder nach der Umwandlung der 3-Vinyl Gruppe in eine Acetylgruppe geschehen (Abb. 1). Die Proteinsequenzen von BchLNB und BchXYZ zeigen große Ähnlichkeit mit den Untereinheiten NifH, NifD und NifK der Nitrogenase (Burke et al., 1993a). BchL/ BchX und NifH zeigen am N-Terminus ein Mg-ATP-Bindungsmotif und vier konservierte Cysteinreste, welche in NifH ein 4Fe-4S Zentrum bilden. Konservierte Cysteinreste finden sich ebenfalls in BchBN und BchYZ, welche vermutlich an der Bildung von Fe-S-Zentren beteiligt sind. Es wird vermutet, dass sowohl BchN und BchY als auch BchB und BchZ $\alpha_2\beta_2$ -Dimere in Analogie zu den NifD- und NifK-Proteinen der Nitrogenasen bilden (Armstrong, 1998). Die gemeinsame Aufreinigung der BchN- und BchB-Proteine in einem Verhältnis von 1:1 unterstützt diese Vermutung (Fujita & Bauer, 2000). Ein Nachweis der Aktivität der lichtunabhängigen Protochlorophyllid-Reduktase in vitro gelang bisher nur in drei Fällen (Peschek et al., 1989; Forreiter & Apel, 1993; Fujita & Bauer, 2000). Für die Chlorophyllid-Reduktaste (BchXYZ) ist dies bisher noch nicht gelungen.

Die vorliegende Arbeit soll durch Bestimmung der von den Stämmen ST3 und GN11 angehäuften und ausgeschiedenen BChl-Vorstufen sowie durch Isolierung von Pigment-Proteinkomplexen aus den ICMs dazu beitragen, das Verständnis der BChl-Biosynthese und des photosynthetischen Apparates in Purpurbakterien besser zu verstehen.

4. Material und Methoden

4.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von Fluka/ Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Ausnahmen werden im Folgenden gesondert genannt. In allen Fällen wurde mit einer MembraPure-Anlage (MembraPure, Bodenheim, Deutschland) gewonnenes Wasser in HPLC Qualität eingesetzt.

4.2 Kultivierung von R. rubrum

Zellen der *R. rubrum* Stämme S1, ST3 und GN11 (Sägesser, 1992) wurden standardmäßig ausgehend von einzelnen Kolonien in 250 ml Schüttelkolben mit vier Schikanen im Dunkeln bei 30°C und 150 UpM kultiviert. Die verwendeten Medien für den Stamm ST3 enthielten 20 µg/ ml Kanamycinsulfat. Als Ausgangsmaterial für Wachstumskurven und die routinemäßige Kultivierung der 100 ml Kulturen dienten 6 ml von Schrägagarkulturen mit Sistrom-Medium M (Sistrom, 1960). Wachstumskurven wurden in M2S- und M2SF-Medien aufgenommen. Um größere Mengen an Zellmaterial zu erhalten, wurden die Stämme ST3 und GN11 in 1 I M2SF-Medium und schließlich in 6 I (2 x 3 I) M2SF+-Medium bei 30°C im Dunkeln kultiviert. Größere Mengen an Zellmaterial der Stämme ST3 und GN11 wurden auch durch Kultivierung bei 30°C im Dunkeln in 1 I M-Medium gewonnen.

Alle verwendeten Medien enthielten die von Hutner (1972) beschriebenen Spurenlösungen. Neben dem klassischen Sistrom-Medium (M-Medium) kamen für die semiaerobe Kultivierung von *R. rubrum* optimierte Medien (M2S, M2SF, M2SF+) zum Einsatz, die zu einer erhöhten Produktion von photosynthetischen Membranen führen (Ghosh *et al.*, 1994) (Sistrom, 1960) (Tab. 1).

	M-	M2S-	M2SF-	M2SF+-
Substanz	Medium	Medium	Medium	Medium
Phosphatpuffer	23 mM	46 mM	46 mM	46 mM
Na-Succinat	20 mM	-	-	-
NH₄CI	8 mM	-	-	-
Nitrilotriessigsäure	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
Asparaginsäure	0,3 mM	0,3 mM	0,3 mM	0,3 mM
Glutaminsäure	0,7mM	0,7mM	0,7mM	0,7mM
KOH	4 mM	4 mM	4 mM	4 mM
Mg_2SO_4	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	7,4 mM	7,4 mM	7,4 mM	7,4 mM
Nicotinsäure	8 mM	8 mM	8 mM	8 mM
Thiamin	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM
Biotin	80 µM	80 µM	80 µM	80 µM
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM
EDTA	1,7 mM	1,7 mM	1,7 mM	1,7 mM
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,8 mM	0,8 mM	0,8 mM	0,8 mM
H_3BO_3	1,8 mM	1,8 mM	1,8 mM	1,8 mM
$MnCl_3 \cdot 4 H_2O$	0,3 mM	0,3 mM	0,3 mM	0,3 mM
$CoCl_2 \cdot 6 H_2O$	70 µM	70 µM	70 µM	70 µM
$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	40 µM	40 µM	40 µM	40 µM
2(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	9 µM	9 µM	9 µM	9 µM
NaCl	2mM	2 mM	2 mM	2 mM
p-Aminobenzoesäure	20 µM	20 µM	20 µM	20 µM
NH₄-Succinat	-	40 mM	40 mM	60 mM
HEPES	-	40 mM	40 mM	32 mM
Fruktose	-	-	18 mM	120 mM

Tab. 1: Zusammensetzung der zur Kultivierung von *R. rubrum* S1, ST3 und Gn11 verwendeten Medien.

4.3 Zellernte

Zellen der semiaeroben Kulturen von *R. rubrum* ST3 und GN11, gewachsen in M2SF+-Medium (6 I) und M-Medium (1 I), wurden durch Zentrifugation bei 4400 x g für 30 min bei 4°C in einer Beckman J2-21 Zentrifuge geerntet. Die Pellets wurden in 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,0 resuspendiert und ein weiteres Mal bei 4400 x g für 30 min zentrifugiert.

Mit einem Spatel wurden die erhaltenen Zellen in eine Petrischale transferiert. In den Zentrifugenröhrchen verbliebenes Zellmaterial wurde durch

Resuspendieren in 50 mM Na-Phospatpuffer pH 7,0 aufgenommen und bei 3000 x g für 30 min zentrifugiert. Das erhaltene Zellmaterial wurde mit einem Spatel in die entsprechende Petrischale transferiert. Die Zellpaste wurde in flüssigem Stickstoff tief gefroren und bei -85°C gelagert. Die Überstände der Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C im Dunkeln gelagert. Alle Schritte der Zellernte wurden unter Grünlichtbedingungen bei 4°C durchgeführt.

4.4. Isolation von Chromatophoren (intrazytoplasmatische Membranen, ICM)

10 g Zellpaste der in M2SF+-Medium semiaerob bei 30°C im Dunkeln gewachsenen Zellen von R. rubrum ST3 bzw. GN11 wurden in 50 mM Na-Phospatpuffer pH 7,0 resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit einer kleinen Spatelspitze DNase und 10 mM PMSF zu einer Endkonzentration von 100 µM versetzt, und die Zellen durch dreimaligen Durchlauf in einer Emulsiflex unter einem Druck von 15000 kPa aufgeschlossen. Um intakte Zellen zu entfernen, wurde die Suspension 10 min bei 2500 x g und 4°C in einer Beckman J2-21 Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde ein weiteres Mal bei 2500 x g für 10 min zentrifugiert. Aus dem zweiten Überstand wurde durch Zentrifugation für 20 min bei 40000 x g äußere Membranen und Zellwandbestandteile abgetrennt. Der Rohextrakt wurde in einer Beckman Ultrazentrifuge L7-65 mit einem 70Ti Rotor bei 180000 x g für 70 min bei 4°C zentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen wasserlöslichen Proteine wurden in flüssigem Stickstoff tief gefroren und bei -85°C gelagert. Der die intrazytoplasmatischen Membranen enthaltende Niederschlag wurde in 20 mM TrisHCl pH 8,0 und 5 mM EDTA resuspendiert, homogenisiert und erneut für 70 min bei 180000 x g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand (1. UZ wash) wurde mit Natrium-Azid zu einer Endkonzentration von 0,02% (w/ v) versetzt und bei 4°C im Dunkeln gelagert. Das Pellet wurde in 20 mM TrisHCl pH 8,0 resuspendiert und mit einem Potter homogenisiert. Durch Zentrifugation des Homogenats bei 180000 x g für 70 min wurden gereinigte Chromatophoren erhalten. Diese wurden in 20 mM TrisHCl pH 8,0 resuspendiert, mit einem Potter homogenisiert, in flüssigem Stickstoff tief gefroren und bei -85°C bis zur Verwendung gelagert. Der Überstand (2. UZ wash) wurde mit Natrium-Azid zu einer Endkonzentration von 0,02% (w/v) versetzt und bei 4°C im Dunkeln gelagert. Alle Schritte zur Gewinnung von Chromatophoren wurden unter Grünlichtbedingungen bei 4°C durchgeführt.



Abb. 3: Schematische Darstellung des Protokolls zur Isolierung von Chromatophoren aus den *R. rubrum* Stämmen ST3 und GN11.

4.5 Isolation von Proteinkomplexen aus Chromatophoren

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von Proteinkomplexen dienten Chromatophoren von *R. rubrum* ST3 und GN11. Die Isolation von Proteinkomplexen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll zur Isolierung von LH1 Komplexen (Stahlberg *et al.*, 1998) (Kessi *et al.*, 1995). Alle Solubilisierungsschritte wurden unter Grünlichtbedingungen bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Chromatophoren wurden in 20 mM TrisHCl pH 8,0 auf eine OD₄₄₅ von 0,3 (Küvette (Quarzglas) mit 2 mm Schichtdicke) suspendiert und mit einem Potter homogenisiert. Die Zugabe von DHPC erfolgte tropfenweise unter Rühren der Suspension bis zu einer Endkonzentration von 8 mM (Kessi *et al.*, 1994). Die Suspension wurde für 60 min unter einem Stickstoffstrom gerührt und anschließend in einer Beckman L7-65 Ultrazentrifuge mit einem 70Ti Rotor bei 180000 x g und 6°C für 60 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 2 ml 20 mM TrisHCl pH 8,0 resuspendiert, DHPC zu einer Endkonzentration von 12 mM tropfenweise unter Rühren und konstantem Stickstoffstrom zugegeben und für 60 min equilibriert. Durch Zentrifugation bei 180000 x g und 6°C für 60 min wurde ein Pellet erhalten, das in 2 ml 20 mM TrisHCl pH 8,0 resuspendiert wurde. Die Suspension wurde mit DHPC zu einer Endkonzentration von 16 mM tropfenweise versetzt, unter einem Stickstoffstrom für 60 min gerührt und anschließend bei 180000 x g zentrifugiert.

Die erhaltenen Überstände der einzelnen Zentrifugationsschritte wurden auf Saccharosegradienten (0,2 M bis 2,0 M), die die entsprechende Menge DHPC (8 mM, 12 mM, 16 mM) enthielten, aufgetragen und in einem Beckman SW40 Rotor bei 120000 x g und 6°C 48 Stunden zentrifugiert. Die Gradienten wurden manuell fraktioniert und die solubilisierten Proteinkomplexe in flüssigem Stickstoff tief gefroren und bei -85°C gelagert.

4.6 Isolation von Bakteriochlorophyllvorstufen

BChl-Vorstufen wurden aus Kulturüberständen der semiaerob im Dunkeln bei 30°C in 6 I M2SF+-Medium bzw. M-Medium kultivierten *R. rubrum* ST3 und GN11 Stämmen, sowie aus den von M2SF+-Kulturen isolierten Chromatophoren gewonnen.



Abb. 4: Schematische Darstellung des Protokolls zur Isolierung von Proteinkomplexen aus Chromatophoren der *R. rubrum* Stämmen ST3 und GN11.

4.6.1 Reinigung von BChl-Vorstufen aus Kulturüberständen von M- und M2SF+-Medien

Die Kulturüberstände von *R. rubrum* ST3 und GN11 aus je 61 M2SF+-Medium wurden mit Hilfe eine Vakuumpumpe über Cellulose-Filterscheiben (589/3 Blue Ribbon, Schleicher & Schuell, Whatman, Brentford, GB) filtriert, um größere Partikel aus der Probe zu entfernen. Der filtrierte M2SF+-Kulturüberstand wurde ein weiteres Mal mit Hilfe einer Vakuumpumpe über Versapore-200 Filter (Porengröße 0,2 µm, Pall Gelman, Dreieich, Germany) filtriert. Die im Filter zurückgehaltenen BChl-Vorstufen wurden unter einem Stickstoffstrom getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -85°C gelagert. BChl-Vorstufen von Kulturüberstände der *R. rubrum* ST3 und GN11 M-Medium Kulturen konnten direkt über Versapore-200 Filter gewonnen werden. Um die BChl-Vorstufen von den Filtern zu lösen, wurden diese mit 3 ml Methanol in eine Petrieschale gegeben und mindestens 60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln langsam schüttelnd inkubiert. Die erhaltenen BChl-Vorstufen wurden mittels HPLC (siehe 4.15), Dünnschichtchromatographie (4.13) und Normal-Phasen-Flüssigkeits-Chromatographie (siehe 4.14) weiter gereinigt.

4.6.2 Isolation der an ST3/ GN11 Chromatophoren gebundenen BChl-Vorstufen

Zur Extraktion der an Chromatophoren gebundenen BChl-Vorstufen wurde ein auf dem von Wessel & Flügge (1984) beschriebenen Protokoll zur Fällung von Proteinen für die Gelelektrophorese (Dichlormethanextraktion siehe 4.8.1) eingesetzt. Alle Schritte der Isolation wurden unter Grünlichtbedingungen durchgeführt. Die Zentrifugation der gefällten Proteine erfolgte für 5 min bei 16500 x g und 4°C. Die Überstände der beiden Zentrifugationsschritte wurden vereinigt und unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Die erhaltenen BChl-Vorstufen wurden in Methanol gelöst und bei -85°C gelagert.

4.7 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry-Peterson

Die Proteinkonzentration unterschiedlicher Proben wurde nach der von Peterson (1977) modifizierten Lowry *et al.* (1951)-Methode bestimmt. Folgende Reagenzien wurden hierfür benötigt:

(1) 0,2% (w/v) Kupfer(II)-sulfat + 0,4 % (w/v) Dinatriumtatrat in H₂O (2) 20% (w/v) Dinatriumcarbonat (3) CTC-Lösung: 1 Vol Lösung (1) und 1 Vol Lösung (2) (4) 10% (w/v) SDS (5) 0,8 N Natriumhydroxid (6) 2 N Folin-Reagenz (7) 0,15% (w/v) Natriumdeoxycholat (DOC) (8) 72% (w/v) Trichloressigsäure (9) BSA (1 mg/ml) in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,0 (10) Lösung A: je 1 Vol (3), (4), (5), und H₂O (11) 1 Vol Lösung (6) + 5 Vol H₂O

Um die Proteinkonzentration einer Probe zu bestimmen, wurden 10 µl bis 100 µl der Proteinprobe (BSA als Standard) in einem Eppendorf Reaktionsgefäß mit H_2O auf ein Endvolumen von 1 ml gebracht. Nach Zugabe von 100 µl Lösung (7) wurden die Proben sorgfältig gemixt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Lösung (8) zugegeben, gemixt und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach diesem Fällungsschritt wurden die Proben 20 min bei 16500 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und die Proben entweder für mindestens 3 Stunden bei 45°C oder über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Zu den getrockneten Pellets wurden 0,5 ml H₂O und anschließend 0,5 ml Lösung A gegeben. Die Proben wurden sorgfältig gemixt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 0,25 ml Lösung (11) wurden die Proben 45 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Absorption bei 750 nm gegen H₂0 als Referenz gemessen.

4.8 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli (1970) in einer BioRad Gelapperatur (BioRad MINIPROTEAN II, München, Deutschland) unter der Verwendung folgender Reagenzien durchgeführt:

Puffer A (100 ml):	30 g Acrylamid/ 0,8 g Bisacrylamid
Puffer B (100 ml):	18,7 g Trisbase eingestellt mit 2 N HCl auf pH 8,8
Puffer D (100 ml):	6,06 g Trisbase eingestellt mit 2 N HCl auf pH 6,8
Elektrodenpuffer (10x) (11)	: 30 g Trisbase
	141 g Glycin
	20 g SDS
Probenpuffer (10ml):	1 ml 0,5 M EDTA
	2,5 ml 1,16 M TrisHCl pH 6,8
	2,5 ml Glycerin
	1,0 g SDS
	1,0 mg Bromphenolblau
	2,5 ml 1 M DTT

Für ein 12,5% iges Trenngel wurden 9,18 ml Puffer A, 4,72 ml H₂O, 7,5 ml Puffer B und 0,24 ml 10% SDS in einer kleinen Saugflasche gemischt und 20 min mit einer Vakuumpumpe entgast. 1 ml APS (160 mg/ 10 ml) und 12 μ l TEMED wurden zugegeben, um die Polymerisationsreaktion zu starten. Eine Überschichtung der gegossenen Gele mit 0,1% SDS sollte diese vor dem Austrocknen während der Polymerisation über Nacht schützen. Für das Sammelgel wurden 1,1 ml Puffer A, 5,74 ml H₂O, 1,25 ml Puffer D und 0,1 ml 10% SDS in eine kleine Saugflasche gegeben. Die Lösung wurde 20 min mit einer Vakuumpumpe entgast und die Polymerisation durch Zugabe von 1 ml APS und 5 μ l TEMED gestartet. Die Gele liefen mit einer Spannung von 140 V.

4.8.1 Proteinfällung für die SDS-PAGE

 $1 \mu g$ bzw. $10 \mu g$ Protein (für Silberfärbung bzw. Coomassie- und Häm-Färbung) wurden mit H₂O auf ein Endvolumen von 100 μ l gebracht und durch eine der folgenden Methoden gefällt. **Methanolfällung:** Zu den 100 µl jeder Probe wurden 300 µl MeOH gegeben, sorgfältig gemischt und die Proben zur Fällung für 20 min bei Raumtemperatur belassen. Das nach 20 min Zentrifugation bei 16500 x g und Raumtemperatur gewonnen Pellet wurde in einem Exsikkator für 3 min getrocknet.

Dichlormethan (DCM) Extraktion (Wessel & Flügge, 1984): 400 µl MeOH wurden zu den 100 µl jeder Probe gegeben und gemischt. Anschließend wurden 100 µl DCM zugegeben und erneut gemischt. Nach Zugabe und Mischen von 300 µl H₂O wurden die Proben für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Entfernen der oberen MeOH/ H₂O-Phase wurden 300 µl MeOH zur unteren DCM/ MeOH/ H₂OPhase gegeben, gemischt und für 20 min bei 16500 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das erhaltene Pellet 3 min im Exsikkator getrocknet. Bei den im Protokoll genannten Mix-Schritten wurden die Proben 30 Sekunden auf einem Vortex-Schüttler sorgfältig gemixt.

Trichloressigsäure Fällung: Die Proben wurden mit 400 μ l H₂0 auf ein Volumen von 500 μ l gebracht, 50 μ l 72% TCA zugegeben und mindestens 30 Sekunden gemischt. Zur Fällung der Proteine wurden die Proben für mindestens 45 min bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurden die Proben 20 min bei 16500 x g und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet 3 min im Exsikkator getrocknet.

4.8.2 Probenvorbereitung für die SDS-PAGE

Zu dem getrockneten Proteinpellet (4.8.1) wurden $15 \mu I H_2O$ und $4 \mu I$ Probenpuffer gegeben. Diese wurden mindestens 30 Sekunden sorgfältig gemischt und für 90 Sekunden in einem Wasserbad bei 100°C erhitzt. Der LMW-Marker ("LMW Electrophoresis Calibration Kit", Pharmacia Biotech, Little Chalfont, GB) wurde für 30 Sekunden im Wasserbad erhitzt. Die Proben wurden für mindestens 30 Sekunden gemischt und 5 min bei 16500 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Überstände wurden direkt auf das Gel aufgetragen.

4.8.3 Silberfärbung

Für die Silberfärbung von SDS-Gelen wurden Silberfärbelösungen von BioRad eingesetzt. Die Gele wurden nach Ende des Gellaufes in eine Glasschale gegeben und nacheinander in den entsprechenden Lösungen inkubiert (Tab. 2). Alle Schritte wurden auf einem Schüttler bei Raumtemperatur durchgeführt. Der Entwickler wurde auf 30° C vorgewärmt. Vor dem Trocken wurden die Gele mindestens 30 min in H₂0 gegeben.

Folgende Lösungen wurden eingesetzt:

Lösung 1:	40% MeOH/ 10% HAc/ 50% H ₂ O
Lösung 2:	10% EtOH/ 5% HAc/ 85% H ₂ O
BioRad Lösungen 2	zur Silberfärbung (Oxidierer, Silberlösung, Entwickler)
Stopp-Lösung:	5% HAc

Tab. 2: BioRad Protokoll zur Silberfärbung

Schritt	Lösungen	Volumen	Inkubationszeit [min]
1	Lösung 1	200 ml	30
2	Lösung 2	200 ml	15
3	Lösung 2	200 ml	15
4	Oxidierer (1:10 verdünnt)	100 ml	20
5	H ₂ O	200 ml	5
6	H ₂ O	200 ml	5
7	H ₂ O	200 ml	5
8	H ₂ O	200 ml	5
9	Silberlösung	100 ml	20
10	H ₂ O	200 ml	1
11	Entwickler	200 ml	30 Sekunden
12	Entwickler	200 ml	bis 5
13	Entwickler	200 ml	bis 5
14	Stopplösung	200 ml	30

4.8.4 Coomassie Färbung

Nach Ende des Gellaufes wurden die Gele in einer Glasschale mit Coomassie-Blue-Lösung (0,5% Coomassie-Brilliant-Blue R250 (Pharmacia) in 50% EtOH/ 7% HAc/ 43% H₂O) bedeckt und über Nacht zum Färben auf einem Schüttler belassen. Die Gele wurden mit einer Lösung aus 35% EtOH/ 15% HAc/ 50% H₂O entfärbt. Zum Stoppen der Entfärbereaktion wurden die Gele in H₂O transferiert und vor dem Trocknen mindestens 30 min in H₂O belassen.

4.8.5 Hämfärbung

Für die Hämfärbung wurden folgende Lösungen verwendet (Goodhew *et al.*, 1986; Thomas *et al.*, 1976):

- 1,25 mM TMBZ in MeOH
- 0,25 M NaOAc pH 5,0
- 0,26 M H₂O₂
- TMMN-Lösung: TMBZ-MeOH/ NaOAc (30/70)
- PrOH/ NaOAc (30/ 70)

Die Gele wurden nach Ende des Laufes in Glasschalen gelegt und in 100 ml TMMN 10 min geschwenkt. Nach Zugabe von 11 ml H_2O_2 und weiterem Schwenken für 15 bis 20 min wurden blau gefärbte Häm-Banden mit Hilfe einer Pasteurpipette markiert. Die Gele wurden zweimal 5 min in 100 ml PrOH/NaOAc gewaschen und einer Coomassiefärbung unterzogen (siehe 5.8.4).

4.9 UV/VIS-Spektroskopie

Zur Aufnahme von Wachstumskurven wurde die optische Dichte der Zellkulturen bei 660 nm, 667 nm und 880 nm mit einem UV/VIS Photometer (Ultraspec II, LKB Biochrom, Cambridge, GB) und einer Küvette mit Schichtdicke von 4 mm gemessen.

Kontinuierliche Spektren wurden mit einem JASCO V-560 UV/VIS Spektrophotometer ausgestattet mit einem Detektor für trübe Proben aufgenommen. Für die Messungen wurden Küvetten (Quarzglas, Hellma, Müllheim, Deutschland) mit einer Schichtdicke von 2 mm eingesetzt. Folgende Parameter wurden für Standardspektren verwendet:

Schlitzbreite:	2 nm
Ansprechverhalten:	schnell
Datenabstand:	1 nm
Scangeschwindigkeit:	200 nm/ min
Wellenlägenbereich:	250 nm – 900 nm

Spektren ganzer Zellen wurden in M-Medium oder in M-Medium mit 20% Glycerin aufgenommen. Chromatophoren und isolierte Proteinpartikel wurden in 20 mM TrisHCI pH 8,0 gemessen. Spektren isolierter BChI-Vorstufen aus Kulturüberständen oder aus Chromatophoren wurden in Methanol und Ether bestimmt.

Spektren von Proben, die sehr geringe Konzentrationen an BChl-Vorstufen aufwiesen, wurden mit einem OLIS DW2a UV/VIS-Spektrophotometer aufgenommen, bei dem der Probenhalter nahe am Photomultiplier montiert war. Folgende Parameter wurden für die Aufnahme der Spektren verwendet:

Anzahl Scans:	1 bis 3
Aufnahmen/ Datum:	20 bis 200
Datenpunkte:	150
Wellenlängenbereich:	375 nm – 700 nm

Die BChl-Vorstufen wurden für die Messungen in 1 ml Methanol gelöst und in Küvetten (Quarzglas, Hellma, Müllheim, Deutschland) mit 1 cm Schichtdicke gemessen.

4.10 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren isolierter BChl-Vorstufen wurden mit einem Fluorolog-3 Fluoreszensspektrophotometer (Horiba Jobin-Yvon) aufgenommen. Die BChl-Vorstufen wurden in 1 ml Ether gelöst und in einer quadratischen Küvette mit 1 cm Kantenlänge (Quarzglas, Hellma, Müllheim, Deutschland) gemessen. Für Emissionsspektren wurden die Proben bei einer Wellenlänge von 400 nm angeregt und die Emission im Bereich von 420 nm bis 760 nm aufgenommen. Die Schlitzbreite betrug sowohl für den Anregungsstrahl als auch für den Emissionsstrahl 2 nm.

4.11 Circulardichroismus (CD)

Nah-IR CD Messungen wurden mit einem JASCO J-715 Spektropolarimeter und einem nah-infrarot sensitiven Photomultiplier durchgeführt. Proben und Photomultiplier wurden während der Messungen unter einem kontinuierlichen Stickstoffstrom gehalten. Die eingesetzten zylindrischen Küvetten (Quarzglas, Hellma, Müllheim, Deutschland) hatten eine Schichtdicke von 2 mm. Die folgenden Parameter wurden für die Messungen verwendet:

Anzahl Scans:	1 bis 4
Datenabstand:	1 nm

Schlitzbreite:	5 nm
Ansprechverhalten:	4 s
Sensitivität:	Standard
Scangeschwindigkeit:	20 nm/ min
Wellenlängenbereich:	600 nm – 800 nm

Die Proben wurden vor der Messung bei Raumtemperatur 10 min im Exsikkator entgast und mit einem Branson Sonifier 450 (duty cycle: constant, output control: 1) 2 min auf Eis beschallt. Die Messungen erfolgten in 20 mM TrisHCl pH 8,0 und 15 mM Na-Ascorbat.

4.12 Massenspektroskopie

Die massenspektroskopische Anaylse von gereinigten BChl-Vorstufen wurde von Dr. Joachim Opitz am Institut für Organisch Chemie der Universität Stuttgart durchgeführt. Es wurden gereinigte BChl-Vorstufen, die durch präparative Dünnschichtchromatograpie und präparative HPLC gewonnen wurden, untersucht. Hierzu wurden FAB positiv-Ion Massenspektren, unter Verwendung einer 3-Nitrobenzyl-Alkohol Matrix angefertigt.

4.13 Dünnschichtchromatographie (DC)

Für Standarddünnschichtchromatogramme unterschiedlicher Proben wurden DC-Glasplatten (SILGUR-25 UV₂₅₄, 20 cm x 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm, Machery & Nagel, Düren, Deutschland) mit einer Kieselguhr Auftragsschicht und Kieselgeltrennschicht eingesetzt. Als Laufmittel dienten DCM/ MeOH/ H₂O (85/30/4) (v/v/v) oder CHCl₃/MeOH/H₂O (85/30/4) (v/v/v). Für die 2D-DC wurden DC-Glasplatten (N-25, 20 cm x 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm, Machery & Nagel, Düren, Deutschland) mit Kieselgeltrennschicht verwendet. Die Platten wurden in der ersten Dimension mit DCM/ MeOH/ H₂O (85/ 30/ 4) (v/ v/ v) und in der zweiten Dimension mit MeOH/ Aceton/ H₂O (20/ 4/ 3) (v/ v/ v) entwickelt (Shioi, 1991). In Methanol oder Ether gelöste und zuvor gereinigte Proben von BChl-Vorstufen wurden vor dem Auftragen unter einem konstanten Stickstoffstrom getrocknet und in 5 µl DCM gelöst. BChl-Vorstufen, die durch Filtration aus Kulturüberständen gewonnen wurden (4.6.1), wurden vor dem Auftragen nach einem modifizierten Protokoll von Ames (1968) extrahiert. Hierzu wurde 100 µl Probe mit 400 µl DCM/ MeOH (1/2) (v/v) sorgfältig gemischt. Nach Zugabe von 200 µl H₂0 und 200 µl DCM und erneutem Mischen der Probe wurde diese 5 min

bei 4°C und 3000 x g zentrifugiert. Die DCM-Phase wurde abgenommen und die Extraktion wiederholt. Die in der DCM-Phase extrahierten BChl-Vorstufen wurden unter einem konstanten Stickstoffstrom getrocknet und in 5 µl DCM aufgenommen. Um nicht oder nur schwach sichtbare Banden auf den entwickelten Dünnschichtchromatogrammen zu detektieren, wurden diese einer lodfärbung unterzogen. Die Platten wurden hierzu 10 bis 20 min in eine mit loddampf gesättigte DC-Kammer gegeben. Auf einem UV-Leuchttisch wurden die Chromatogramme zusätzlich auf fluoreszierende Banden untersucht. Um Proteinreste in den Proben nachzuweisen, wurde eine Ninhydrinfärbung durchgeführt. Die Platten wurden mit einer 1% igen (in Ethanol) Ninhydrinlösung besprüht, unter dem Abzug getrocknet und bei 80°C im Trockenschrank 10 min entwickelt.

Um größere Mengen an gereinigten BChl-Vorstufen zu erhalten; wurde eine präparative Dünnschichtchromatographie durchgeführt. 300 µl bis 500 µl der durch Filtration erhaltenen BChl-Vorstufen-Lösung (4.6.1) wurden unter einem Stickstoffstrom getrocknet und in 75 µl bis 100 µl DCM aufgenommen. Diese wurden anschließend auf eine DC-Glasplatte (SILGUR-25 UV₂₅₄) aufgetragen und mit DCM/ MeOH/ H₂O (85/ 30/ 4) (v/ v/ v) als Laufmittel innerhalb von 40 min aufgetrennt. Die einzelnen Banden wurden mit einem Spatel von der Glasplatte gelöst und in ein Eppendorfreaktionsgefäß transferiert. 1 ml des Laufmittels wurde zugegeben und sorgfältig auf einem Vortex-Schüttler gemischt. Nach einer Zentrifugation für 2 min bei 16500 x g und 4°C wurde der Überstand abgenommen, das Pellet erneut in 1 ml Laufmittel resuspendiert und zentrifugiert. Die beiden Überstände wurden zusammengeführt und unter einem konstanten Stickstoffstrom getrocknet. Die so gereinigten BChl-Vorstufen wurden in 100 µl MeOH aufgenommen. Alle Schritte der präparativen DC wurden unter Grünlichtbedingungen durchgeführt.

4.14 Normal-Phasen-Flüssigkeits-Chromatographie

Die Normal-Phasen-Flüssigkeits-Chromatographie der im Filtrationsschritt gewonnenen BChl-Vorstufen von ST3 und GN11 M2SF+-Kulturüberständen erfolgte auf einer Säule 24,5 cm x 2,5 cm mit einem Volumen von 120 ml. Als Matrix wurde Kieselgel 60 (0,040 mm – 0,063 mm) in DCM/ 2% MeOH verwendet. 2 ml der isolierten BChl-Vorstufen wurden auf die Säule aufgetragen und mit 2 Säulenvolumen (240 ml) DCM/ 2% MeOH unter Druck mit einer Handpumpe über die Säule geleitet. Anschließend erfolgte ein Wechsel auf DCM/ 4% MeOH als Laufmittel, von dem ebenfalls 2 Säulenvolumen (240 ml) unter zu Hilfenahme der Handpumpe über die Säule geleitet wurden.

Folgende Fraktionen wurden während der Elution gesammelt:

- 1) 2 Säulenvolumen (DCM/ 2% MeOH)
- 2) DCM/ 4% MeOH bis zur 1. Bande
- 3) 1. Bande
- 4) 2. Bande
- 5) 3. Bande
- 6) Nach der 3. Bande

Die gesammelten Fraktionen wurden an einem Rotationsverdampfer getrocknet, in 1 ml MeOH resuspendiert und in ein Eppendorfreaktionsgefäß transferiert. Um die Proben zu konzentrieren, wurden diese unter einem konstanten Stickstoffstrom getrocknet und anschließend in 100 µl MeOH aufgenommen.

4.15 Hoch-Druck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Analysen isolierter BChl-Vorstufen von *R. rubrum* ST3 und GN11 wurden mit einer HPLC-Anlage (BioRad) durchgeführt. Das System bestand aus 2 BioRad 1350T-Soft-Start-Pumpen, einem BioRad Series 400 HRLC Gradient Module und einem Jasco UV-970 Detektor. Die Proben wurden manuell über ein Einspritzventil (Rheodyne) mit 20 µl Probenloop appliziert. Die Steuerung erfolgte über die BioRad-HRLC-Software. Zur Trennung wurde eine Lichroma Nucleosil C18 Säule (250 mm, 4,6 mm ID, Partikelgröße 10 µm, Altech, Columbia, USA) mit einer Nucleosil-C18 Vorsäule (10 mm, 4,6 mm ID, Partikelgröße 5 µm, Supelco, Bellefonte, PA, USA) und ein Gradientensystem mit MeOH/ Aceton/ H₂O (64/16/20) (v/ v/ v) (Puffer A) und MeOH/ H₂O (80/20) (v/ v) (Puffer B) (Tab. 3) verwendet. Alle Puffer wurden filtriert und entgast. Die Proben vorbereitung und Applikation erfolgte unter Grünlichtbedingungen. Die Proben wurden jeweils unter einem konstanten Stickstoffstrom getrocknet und in 20 µl MeOH/ Aceton/ H₂O (64/16/20) (v/ v/ v) gelöst.

Für die Reinigung von BChl-Vorstufen wurden Fraktionen der einzelnen Peaks gesammelt und die entsprechenden Proben mehrerer HPLC-Läufe vereinigt. Um die Proben weiter zu konzentrieren und das Laufmittel der HPLC zu entfernen, wurden die Proben unter einem Stickstoffstrom getrocknet und in 20 µl Methanol resuspendiert.

Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Flußrate [ml]	Injektion
0	100	0	1	
10	100	0	1	Ι
40	0	100	1	
70	0	100	1	
80	100	0	1	
90	100	0	1	
90,5	100	0	0	

Tab. 3: Für die HPLC verwendeter Gradient. Puffer A (MeOH/ Aceton/ H₂O), Puffer B (MeOH/ H₂O) (Shioi, 1991)

4.16 Komplementations-Assay isolierter Proteinkomplexe

Um die Komplementationsfähigkeit von isolierten *R. rubrum* ST3 und GN11 Proteinkomplexen aus Chromatophoren zu prüfen, wurde ein auf dem Nitrogenaseassay basierender modifizierter Komplementationsansatz eingesetzt (Saari *et al.*, 1984). Die unterschiedlichen Komponenten der Ansätze wurden wie in Tabelle 4 beschrieben gemischt und für die angegebenen Zeiten bei Raumtemperatur equilibriert. Die Ansätze wurden durch UV/VIS-Spektroskopie (4.9) analysiert. Alle Schritte wurden unter Grünlichtbedingungen durchgeführt und die eingesetzten Lösungen direkt vor der Verwendung entgast.

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4
ST3-Komplexe	132 µg	132 µg	132 µg	-
GN11-Komplexe	140 µg	140 µg	-	140 µg
DHPC (32%)	8 mM	16 mM	8 mM	8 mM
H ₂ O	ad 0,5 ml	ad 0,5 ml	ad 0,5 ml	ad 0,5 ml
Equilibrierung	10 min bei Raumtemperatur			
1 M TrisHCl pH 7,5	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
0,12 M MgCl ₂	6 mM	6 mM	6 mM	6 mM
0,26 M Na ₂ S ₂ O ₄	13 mM	13 mM	13 mM	13 mM
0,1 M NaATP	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM
DHPC (32%)	8 mM	8 mM	8 mM	8 mM
H ₂ O	ad 1 ml	ad 1 ml	ad 1 ml	ad 1 ml
Equilibrierung	10 min bei Raumtemperatur			

Tab. 4: Zusammensetzung der Komplementationsansätze (1, 2) und der Kontrollansätze (3, 4) isolierter Proteinkomplexe von *R. rubrum* ST3 und GN11.

4.17 Elektronenmikroskopie gereinigter Protein-Pigmentkomplexe

Für Elektronenmikroskopische Aufnahmen der gereinigten Protein-Pigmentkomplexe wurden die Proben mit Uranylacetat negativkontrastiert und Bilder in einem Zeiss EM10 bei 60 kV und einer Vergrößerung von x 20000 aufgenommen.

4.18 Ansäuerung der isolierten Pigmente

Um in den Pigmenten gebundenes Magnesium nachzuweisen, wurden 5 µl der von DC-Platten isolierten Pigmente in 600 µl Ether gelöst und mit zwei Tropfen 2 M HCl angesäuert. Die Proben wurden sorgfältig gemischt und Absorptionsspektren der Proben aufgezeichnet.

5. Ergebnisse

5.1 Wachstumskurven

Wachstumskurven von R. rubrum ST3 und R. rubrum S1 (Wildtyp) in M2SF-Medium unter semiaeroben Bedingungen im Dunkeln bei 30°C sind in Abb. 5 gezeigt. Verfolgt man das Wachstum der Kulturen anhand der Trübung (Absorption bei 660 nm) zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Stämmen. Der Wildtypstamm zeigt eine Wachstumsrate von $0,175 - 0,205 h^{-1}$, der Stamm ST3 eine Wachstumsrate von 0,167 – 0,195 h⁻¹ und wächst somit geringfügig langsamer als der Wildtyp. Im Gegensatz dazu ist die Produktion von intracytoplasmatischen Membranen (Absorption bei 880 nm) bei ST3 im Vergleich zu S1 etwa halbiert. Der Wildtyp bildete nach ca. 20 h verstärkt ICMs bezogen auf die Zellzahl (A₈₈₀/A₆₆₀) und erreichte nach etwa 52 h einen Wert A₈₈₀/A₆₆₀ von 1,7, der bis zum Ende der Kulturführung konstant blieb. Bei der Mutante ST3 war eine verstärkte Bildung von ICMs im Bezug auf die Zelldichte nicht zu beobachten. Verfolgt man die Produktion von ICMs anhand der Absorption der von ST3 gebildeten BChl-Vorstufen (Absorption bei 667 nm) und nicht anhand des vollständig gebildeten und in die Membranen eingelagerten BChl (Absorption bei 880 nm), zeigte auch der Stamm ST3 eine Zunahme der intracytoplasmatischen Membranen (Abb. 5). Das Verhältnis 667 nm/ 660 nm zeigt im Wildtyp Stamm unverändert eine Zunahme der ICMs im Verhältnis zur Zellmasse.

Abbildung 6 zeigt einen Vergleich von Wachstumskurven von *R. rubrum* ST3 unter semiaeroben Bedingungen im Dunkeln bei 30°C in M2S- und M2SF-Medium. Die Messungen der Trübung der Kulturen zeigt, dass die Zellen in M2SF-Medium eine höhere Dichte erreichen. Auch bei der Produktion an ICMs ist ein ähnlicher Kurvenverlauf wie bei der Zelldichte zu beobachten, so dass die in M2SF-Medium kultivierten Zellen am Ende des Zeitverlaufs eine höhere Absorption erreichen. Das Verhältnis der Absorptionen A₈₈₀/A₆₆₀ zeigt keinen Unterschied zwischen den in den verschiedenen Medien kultivierten Zellen. ST3 bildete in diesem Medium gleiche Mengen an ICMs bezogen auf die Zelldichte.

Die aufgenommenen Absorptionsspektren sollen der Beschreibung der BChl-Vorstufen bzw. des BChl dienen, so dass Peaks anderer Chromophoren (Cytochrome, Karotenoide) nicht aufgeführt werden. Um die in den Stämmen angehäuften oder von ihnen ausgeschiedenen Pigmente zu beschreiben, wird das Maximum im roten Wellenlängenbereich als charakteristischer Peak des Pigments oder des Stammes benannt werden. Absorptionsspektren der Stämme *R. rubrum* ST3 und S1, die in M2SF-Medium gewachsen sind, sind in Abbildung 7 gezeigt.



Abb. 5: Wachstumskurven von *R. rubrum* ST3 (\circ , \bullet) und *R. rubrum* S1 (\Box , \blacksquare) in 100 ml M2SF-Kulturen. A) Absorption bei 660 nm, B) Absorption bei 880 nm, C) Verhältnis der Absorptionen A₈₈₀/A₆₆₀, D) Absorption bei 660 nm, E) Absorption bei 667 nm, F) Verhältnis der Absorptionen A₆₆₇/A₆₆₀. Messungen der optischen Dichte wurden von je 1 ml Kultur mit einer Küvette der Schichtdicke 4 mm durchgeführt.

26



Abb. 6: Wachstumskurven von *R. rubrum* ST3 in M2S-Medium (\blacktriangle) und M2SF-Medium (\circ) in 100 ml Kulturen. A) Absorption bei 660 nm, B) Absorption bei 880 nm, C) Verhältnis der Absorptionen A₈₈₀/A₆₆₀. Messungen der optischen Dichte wurden von je 1 ml Kultur mit einer Küvette der Schichtdicke 4 mm durchgeführt.



Abb. 7: Absorptionsspektren von *R. rubrum* ST3 (A) und S1 (B) in M2SF-Medium von jeweils der Gesamtkultur, dem Kulturüberstand und Zellen. Die Spektren sind mit 20% Glycerin aufgenommen. Zellen von ST3 zeigen einen charakteristischen Peak bei 663 nm, die von S1 bei 880 nm.



Abb. 8: Absorptionsspektren von *R. rubrum* ST3 Kulturüberständen bei Kultivierung in M2S-, M2SF- oder M2SF+-Medium. Der Ausschnitt rechts oben zeigt die zweite Ableitung der geglätteten Spektren im Bereich von 630 nm bis 720 nm und die Unterschiede der Peaks.

Das Spektrum der ST3 Gesamtkultur zeigt Maxima bei 411 nm, 513 nm, 547 nm, 617 nm und 673 nm. Zellen von ST3 zeigen Maxima bei 411 nm, 509 nm, 542 nm, 608 nm und 663 nm. Der Peak bei 663 nm stellt gleichzeitig den charakteristischen Peak der *R. rubrum* ST3 Mutante dar. Die in das Medium ausgeschiedenen Pigmente wurden im Kulturüberstand gemessen und verursachen im Spektrum Maxima bei 393 nm und 672 nm. Beim ST3 Stamm werden rund 8 % der Pigmente ins Kulturmedium ausgeschieden. Die übrigen Pigmente sind in den Zellen gebunden. Die Kultur des Wildtyp-Stammes zeigt Maxima bei 375 nm, 506 nm, 589 nm, 804 nm und 880 nm, die auch im Spektrum der Zellen mit kleinen Abweichungen (508 nm statt 506 nm und 800 nm statt 804 nm) zu finden sind. Beim Wildtyp werden nur geringfügig Pigmente (nur 0,04 %) in das Medium ausgeschieden. So gut wie alle Pigmente sind hier in den Zellen gebunden.

Die Absorptionsspektren von *R. rubrum* ST3 Kulturüberständen aus verschiedenen Medien zeigen Unterschiede im Bereich zwischen 630 nm und 720 nm (Abb. 8). Während bei einer Kultivierung von *R. rubrum* ST3 in M2S- und M2SF-Medium die ausgeschiedenen Pigmente zwei Peaks bei 647 nm und 673 nm zeigen, ist bei einer Kultivierung in M2SF+-Medium nur ein Peak bei 678 nm zu beobachten. Die Pigmente im Überstand einer M2SF-Kultur absorbieren stärker bei

673 nm als bei 647 nm, während die der M2S-Kultur eine größere Absorption bei 647 nm zeigen.

5.2 Charakterisierung von Proteinkomplexen aus R. rubrum ST3 und GN11 ICMs

Das Ergebnis einer SDS-PAGE mit Proben der Isolationsschritte zur Gewinnung von R. rubrum ST3 und GN11 Chromatophoren ist in Abbildung 9 dargestellt. Die Häm-Färbung zeigt eine Bande bei 30 kDa, die Cytochrom c1 zuzuordnen ist. Eine weitere Häm-Bande bei 44 kDa enthält vermutlich b-Typ Cytochrome und möglicherweise die Cytochromoxidase. Bei der unteren Häm-Bande (12 kDa) handelt es sich um weitere c-Typ Cytochrome (vorwiegend Cytochrom c₂ und Cytochrom c'). In der Fraktion der WSP sind in der Häm-Färbung bei beiden Stämmen nur die c-Typ Cytochrome nachzuweisen. Diese konnten in allen Proben nachgewiesen werden. Die beiden zuerst genannten Banden waren nicht in allen Fraktionen vorhanden. In der Coomassie-Färbung zeigen sich insgesamt nur sehr geringe Unterschiede. Nur in den Proben der WSP und des 1. UZ wash sind im Coomassie gefärbten Gel Unterschiede zwischen den beiden Stämmen zu erkennen, die aber für die weiteren Untersuchungen keine Rolle spielen. Die Chromatophoren der beiden Stämme, aus denen im Folgenden mit Hilfe von DHPC Proteinkomplexe isoliert wurden, lassen keine Unterschiede erkennen.

In den Saccharose-Gradienten zur Isolierung von Proteinkomplexen aus R. rubrum ST3 und GN11 Chromatophoren ergaben sich nach der Ultrazentrifugation die in Abbildung 10 schematisch dargestellten Banden. Der Gradient von ST3 Proteinkomplexen in 8 mM DHPC zeigte eine starke, scharfe, grüne Bande. Mit 16 mM DHPC isolierte Proteinkomplexe von ST3 zeigten im Saccharose-Gradienten zwei Banden. Die obere, schwache Bande ist braun-grün, die untere, sehr schwache Bande braun gefärbt. Die Gradienten mit isolierten Proteinkomplexen von GN11 zeigten in beiden Fällen zwei Banden. Bei Proteinkomplexen, die mit 8 mM DHPC isoliert wurden, ist eine obere, scharfe, grüne und eine untere, sehr schwache, rotbraune Bande zu beobachten. Die mit 16 mM DHPC isolierten Proteinkomplexe zeigten eine obere, scharfe, grüne Bande und eine untere, schwache, rotbraune Bande. Diese beiden Banden sind deutlich voneinander getrennt, liegen aber näher beieinander als in den zuvor beschriebenen Fällen.

Die Gele in Abbildung 11 zeigen die aus Chromatophoren von ST3 und GN11 isolierten Proteinkomplexe in der grünen Bande der Saccharose-Gradienten. In den beiden Proben von ST3 sind insgesamt 9 Banden unterschiedlicher Größe


Abb. 9: SDS-PAGE von Proben der Isolationsschritte zur Gewinnung von Chromatophoren. Es wurden gleiche Proteinmengen der entsprechenden Proben von ST3 und GN11 nebeneinander aufgetragen. Das Gel wurde einer Häm-Färbung unterzogen und anschließend mit Coomassie-Blue gefärbt. Häm-Banden sind durch ($^{\circ}$) links neben den entsprechenden Banden gekennzeichnet.



Abb. 10: Schematische Darstellung der Banden in den Saccharose-Gradienten zur Isolation von *R. rubrum* ST3 und GN11 Proteinkomplexen aus Chromatophoren.

zu finden. In der mit 8 mM DHPC extrahierten Probe finden sich zwei Banden (54 kDa, 22 kDa), die in der mit 16 mM DHPC extrahierte Probe nicht zu finden sind. Banden bei 36 kDa, 28 kDa und 10 kDa hingegen zeigt nur die mit 16 mM DHPC extrahierte Probe. Die 10 kDa Bande weist die im Verhältnis aller Banden größte Proteinmenge auf. Die GN11 Proben zeigen ebenfalls insgesamt 9 Banden unterschiedlicher Größe, die sich aber zum Teil von den bei ST3 gefundenen Größen unterscheiden. Bei beiden Stämmen finden sich Banden mit einer Größe von ungefähr 36 kDa, 31 kDa, 23 kDa, 17 kDa, 15 kDa und 10 kDa. Die beiden GN11 Proben unterscheiden sich in den Banden bei 31 kDa und 18 kDa, die sich nur in der mit 16 mM DHPC extrahierten Probe finden. Unterscheide in der Proteinmenge im Vergleich zur mit 16 mM DHPC extrahierten Probe weisen die Banden bei 49 kDa und 17 kDa in der mit 8 mM DHPC extrahierten Probe auf.

Absorptionsspektren der aus den Saccharose-Gradienten isolierten Banden und gereinigter Chromatophoren von *R. rubrum* ST3 und GN11 zeigt Abbildung 12. Chromatophoren von ST3 weisen Peaks bei 414 nm, 509 nm, 540 nm, 608 nm und



Abb. 11: SDS-PAGE isolierter Proteinkomplexe aus Chromatophoren von *R. rubrum* ST3 und GN11. Das Gel mit Proben von ST3 wurde mit Coomassie-Blue, das mit Proben von GN11 mit Silber gefärbt. Spur 1 des ST3 Gels zeigt den LMW-Marker, Spur 2 und 3 Proteinkomplexe isoliert mit 8 mM bzw. 16 mM DHPC. Das zweite Gel zeigt in Spur 1 und 2 Proteinkomplexe von GN11, die mit 8 mM bzw. 16 mM DHPC isoliert wurden, und in Spur 3 den LMW-Marker.



Abb. 12: Absorptionsspektren von *R. rubrum* ST3 (A) und GN11 (B) Chromatophoren und daraus isolierten Proteinkomplexen. Die Isolation der Komplexe erfolgte mit DHPC (8 mM bzw. 16 mM) und anschließender Reinigung in einem Saccharose-Gradienten (vgl. Abb. 10), von dem die braunen und grünen Banden analysiert wurden. Die charakteristischen Peaks sind mit Pfeilen markiert und mit der Wellenlänge des Maximums beschriftet. Chromatophoren (____), grüne Bande 8 mM (---), grüne Bande 16 mM (---), braune Bande 16 mM (---), Vergrößert in A) und B) Spektrum der braunen Bande (16 mM DHPC).

668 nm auf. Die in der grünen Bande des Saccharose-Gradienten (8 mM DHPC) enthaltenen Pigmente besitzen Peaks bei 413 nm, 509 nm, 542 nm, 609 nm und 662 nm. Pigmente von ST3, die in der braun-grünen Bande des Saccharose-Gradienten (16 mM DHPC) enthalten waren, weisen Peaks bei 414 nm, 508 nm, 542 nm, 607 nm und 661 nm auf. Die braune Bande von ST3 im Gradienten mit 16 mM DHPC zeigte nur eine geringe Absorption, so dass nur die Peaks bei 413 nm und 661 nm eindeutig zu identifizieren sind. Im Bereich zwischen 500 nm und 600 nm können eventuell vorhandene Peaks aufgrund des schwachen Signals nicht nachgewiesen werden. Chromatophoren von GN11 besitzen Peaks bei 445 nm, 539 nm, 584 nm und 637 nm. Die Pigmente der grünen Bande von GN11 aus dem Gradienten mit 8 mM DHPC weisen Peaks bei 444 nm, 582 nm und 634 nm auf. Augrund der geringen Absorption der schwachen, rotbraunen Bande des Gradienten mit 8 mM DHPC waren keine eindeutigen Peaks nachzuweisen (in Abb. 12 nicht gezeigt). Peaks bei 444 nm, 542 nm, 581 nm und 634 nm zeigt die grüne Bande aus dem Gradienten mit 16 mM DHPC. Die rotbraune Bande desselben Gradienten zeigt Peaks bei 410 nm, 443 nm und 632 nm. In den grünen



Abb. 13: Nah-IR-CD-Spektren von *R. rubrum* ST3 und GN11 Chromatophoren. Beide Stämme wurden semiaerob im Dunkeln in M2SF+-Medium (schwarz) bzw. M2SF-Medium (grau) kultiviert. (A) CD-Spektrum *R. rubrum* ST3, (B) vom Photomultiplier aufgezeichnetes HT-Spektrum von *R. rubrum* ST3, (C) geglättetes CD-Spektrum *R. rubrum* GN11, (D) vom Photomultiplier aufgezeichnetes HT-Spektrum von *R. rubrum* GN11.

Banden des Saccharose-Gradienten der mit 8 mM bzw. 16 mM DHPC extrahierten Proben von ST3 fanden sich dieselben Pigmente. Auch bei GN11 enthielten die grünen Banden der Saccharose-Gradienten dieselben Pigmente. Im Vergleich der beiden Proben von ST3 enthielt die mit 8 mM DHPC bearbeitete Probe mehr Pigment, bei GN11 zeigte die mit 16 mM DHPC bearbeitete Probe eine höhere Absorption.

Die Ergebnisse der Nah-IR-CD-Spektren von *R. rubrum* ST3 und GN11 Chromatophoren zeigt die Abbildung 13. Chromatophoren von ST3, aus einer M2SF-Kultur, zeigen im CD-Spektrum ein Minimum bei 683 nm, ein kleineres Maximum bei 700 nm und ein größeres Maximum bei 721 nm. Im Verlauf der Hochspannung zeigt sich ein Peak bei 668 nm. ST3 Chromatophoren, von in M2SF+-Medium gewachsenen Zellen zeigen im CD-Spektrum einen ähnlichen Verlauf wie Chromatophoren von Zellen, die in M2SF-Medium kultiviert wurden. Das Spektrum zeigt ein Minimum bei 680 nm und zwei annähernd gleich große Maxima bei 696 nm und 716 nm. Im Verlauf der am Photomultiplier aufgezeichneten Hochspannung zeigt sich ein Peak bei 668 nm. Chromatophoren



Abb. 14: Nah-IR-CD-Spektren von isolierten Proteinkomplexen aus *R. rubrum* ST3 und GN11 Chromatophoren. Beide Stämme wurden semiaerob im Dunkeln in M2SF-Medium kultiviert. Die Komplexe wurden mit 8 mM DHPC (grau), bzw. mit 16 mM DHPC (schwarz) isoliert. (A) CD-Spektrum ST3, (B) vom Photomultiplier aufgezeichnetes HT-Spektrum von ST3, (C) geglättetes CD-Spektrum GN11, (D) vom Photomultiplier aufgezeichnetes HT-Spektrum von GN11.

von GN11 zeigen deutlich verschiedene CD-Spektren und wesentlich schwächere Signale im Vergleich zu Chromatophoren von ST3. GN11 Chromatophoren aus M2SF-Kulturen zeigen im CD-Spektrum nach einem stetigen Absinken des Signals von 800 nm bis 670 nm ein Maximum bei ungefähr 660 nm. Im Verlauf der am Photomultiplier aufgezeichneten Hochspannung zeigt sich ein Peak bei 635 nm. Die Chromatophoren der M2SF+-Kultur zeigen ein Minimum bei 636 nm und einen Nulldurchgang bei 689 nm. Das Hochspannungssignal zeigt in diesem Fall einen Peak bei 638 nm.

Nah-IR-CD-Spektren isolierter Proteinkomplexe aus Chromatophoren von *R. rubrum* ST3 und GN11 zeigt Abbildung 14. CD-Spektren der Proteinkomplexe von ST3 weisen einen ähnlichen Verlauf wie die CD-Spektren der Chromatophoren auf. Allerdings ist das erste Maximum im Spektrum der Chromatophoren hier als Minimum ausgeprägt. Die isolierten Proteinkomplexe zeigen im CD-Spektrum Minima bei 688 nm und 708 nm/ 710 nm sowie ein Maximum bei 734 nm. Im Verlauf der Hochspannung zeigt sich ein Peak bei 663 nm. Die CD-Spektren der isolierten Proteinkomplexe von GN11 zeigen einen nahezu identischen Verlauf. Sie zeigen wie die Chromatophoren dieser Mutante ein Minimum im Verlauf des CD-Spektrums, das im Vergleich zu den Chromatophoren rot verschoben ist und bei ca. 660 nm liegt. Im Verlauf der Hochspannung zeigen die Proben unabhängig von der DHPC-Konzentration bei der Isolation einen Peak bei 661 nm.

Die isolierten Protein-Pigment-Komplexe zeigen bei elektronenmikroskopischer Betrachtung partikuläre, ringförmige Strukturen (Pfeil in Abb. 15). Die Partikel besitzen einen Durchmesser von 9-18 nm. Sie neigen zur Aggregation. Hierbei bilden sich fädige und runde Formen aus.



Abb. 15: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Protein-Pigment-Komplexe (A) und der Aggregationsformen (B) des Pigmentkomplexes von ST3. Negativkontrastierung mit Uranylacetat. Vergrößerung x 20000.

5.2.1 Komplementations-Assay isolierter Proteinkomplexe

Absorptionsspektren der Komplementationsansätze mit isolierten Proteinkomplexen von *R. rubrum* ST3 und GN11 sind in Abbildung 16. gezeigt. Der Kontrollansatz mit Komponenten von ST3 zeigt einen charakteristischen Peak bei 660 nm, die Kontrolle mit Komponenten von GN11 einen charakteristischen Peak bei 633 nm. Die Ansätze mit Proteinkomplexen von ST3 und GN11, die mit 8 mM bzw. 16 mM DHPC isoliert und equilibriert wurden, zeigen charakteristische Peaks der Pigmente beider Stämme. Sowohl der Peak bei 633 nm als auch der bei 660 nm sind unverändert vorhanden. Ein zusätzlicher, längerwelliger Peak ist nicht nachzuweisen. Das gleiche Ergebnis liefert der Ansatz der Komponenten, die mit 16 mM DHPC isoliert wurden. Auch eine längere Inkubationszeit – 120 min statt 10 min – ruft keine Veränderung hervor, und ein zusätzlicher, längerwelliger Peak ist nicht nachzuweisen.



Abb. 16: Spektren des Komplementations-Assay von isolierten Proteinkomplexen aus *R. rubrum* ST3 und Gn11 Chromatophoren nach Inkubation für 10 min oder 120 min und der Kontrollen beider Stämme.

5.3 Charakterisierung der Bakteriochlorophyllvorstufen

5.3.1 Bakteriochlorophyllvorstufen aus Kulturüberständen

Isolierte Pigmente von *R. rubrum* ST3 und GN11 Kulturüberständen aus Mund M2SF+-Kulturen zeigen die in Abbildung 17 dargestellten Absorptionsspektren. Die Spektren der Pigmente von ST3 aus den unterschiedlichen Medien weichen nur in einer Rotverschiebung einzelner Peaks um 1 nm voneinander ab. Im Gegensatz dazu führten die verschiedenen Medien in den Spektren der Pigmente von GN11 zu deutlichen Unterschieden. Pigmente aus M-Medium Kulturüberständen zeigen Peaks bei 438 nm, 506 nm, 542 nm, 580 nm und 630 nm, Pigmente aus M2SF+Medium bei 420 nm, 524 nm, 568 nm, 590 nm und 637 nm.

Eine Auftrennung der aus M2SF+-Medium isolierten Pigmente auf einer DC-Platte (Kieselguhr/ Kieselgel) mit DCM/ MeOH/ H₂0 als Laufmittel ergab für die GN11 Probe eine hellgrüne Bande. Die Pigmente von ST3 spalteten sich in zwei Banden auf: eine weiter oben laufende, hellgrüne Bande (ST3-H) und eine kurz darunter laufende, dunkelgrüne Bande (ST3-L). Das Resultat gleicht dem Ergebnis der DC mit Pigmenten, die aus Chromatophoren isoliert wurden (vgl. Abb. 26).

Fluoreszenzspektren und Absorptionsspektren der von der DC extrahierten Banden ST3-H, ST3-L und von GN11 zeigt Abbildung 18. Bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 400 nm zeigen die Pigmente der ST3-H Bande Peaks bei 425 nm, 453 nm, 512 nm, 586 nm und den Hauptpeak bei 670 nm. Das Spektrum der ST3-L Bande zeigt mehrere kleine Peaks bei 425 nm, 453 nm, 514 nm, 587 nm, 613 nm und 688 nm sowie einen großen Peak bei 660 nm. Die Probe der GN11 Pigmente zeigt kleinere bzw. überlagerte Peaks bei 425 nm, 453 nm, 588 nm, 637 nm, 674 nm und 705 nm. Die beiden größten Peaks finden sich bei 624 nm und 661 nm. Die Absorptionsspektren in Abbildung 18 zeigen für ST3-H Peaks bei 373 nm, 413 nm, 507 nm, 538 nm, 614 nm und den charakteristischen Peak des Pigments bei 665 nm. Die ST3-L Pigmente weisen ihren charakteristischen Peak bei 657 nm auf. Das Spektrum zeigt weitere Peaks bei 367 nm, 407 nm, 504 nm, 534 nm und 601 nm. Im Spektrum der GN11 Pigmente ist der charakteristische Peak bei 631 nm nur schwach ausgeprägt. Im Weiteren zeigt das Spektrum Peaks bei 418 nm, 438 nm, 529 nm, 568 nm und 596 nm.

Eine 2D-DC isolierter BChl-Vorstufen von *R. rubrum* ST3 und GN11 aus Kulturüberständen (M2SF+-Medium) ergab die in Abbildung 20 schematisch dargestellten Banden. Auf der DC mit der Probe der GN11 Pigmente zeigte sich eine hammerförmige, hellgrüne Bande. Im UV-Licht waren vier weitere Spots sichtbar.



Abb. 17: Absorptionsspektren isolierter BChl-Vorstufen aus Kulturüberständen von *R. rubrum* ST3 (A) und GN11 (B), die unter semiaeroben Bedingungen im Dunkeln bei 30°C in M-Medium (grau) und M2SF+-Medium (schwarz) gewachsen sind. Die BChl-Vorstufen wurden durch Filtration aus dem Kulturüberstand gewonnen und in MeOH gelöst. Spektren von ST3 zeigen folgende Maxima. Aus M-Medium: 407 nm, 505 nm, 537 nm, 606 nm und 661 nm. Aus M2SF+-Medium: 406 nm, 505 nm, 537 nm, 605 nm und 662 nm. Spektren von GN11 zeigen folgende Maxima. Aus M-Medium: 438 nm, 506 nm, 542 nm, 580 nm und 630 nm. Aus M2SF+-Medium: 420 nm, 524 nm, 568 nm, 590 nm und 637 nm.



Abb. 18: Fluoreszenz- (grau) und Absorptionsspektren (schwarz) isolierter Banden einer präparativen-DC von *R. rubrum* ST3 und GN11 BChl-Vorstufen aus Kulturüberständen (M2SF+-Medium). (A) ST3-H (obere Bande von DC), (B) ST3-L (untere Bande von DC), und (C) GN11.



Abb. 19: Absorptionsspektren der von einer DC isolierten, und mit HCl angesäuerten BChl-Vorstufen von GN11 (A) und ST3 (B, C). Absorptionsspektren ohne HCl (gepunktete Linie), Absorptionsspektren mit HCl (konstante Linie).

Einer der Spots leuchtete orange unterhalb des Hammerkopfes (F_1). Zwei weitere gelb leuchtende Spots befanden sich oberhalb des Hammerstieles (F_2 , F_3), während eine schwach gelb leuchtende gestreckte Bande unterhalb des Hammerstieles lag (F_4). Die Platte mit den Proben von ST3 zeigte einen hellgrünen und einen dunkelgrünen Spot sowie einen schwachen, gelbgrünen, bogenförmigen Schmier in der rechten oberen Ecke der Platte nahe der Laufmittelfronten.

Absorptionsspektren von GN11 und ST3 Pigmenten, die von einer DC-Platte isoliert und mit HCl angesäuert wurden, zeigt Abbildung 19. Das Spektrum der GN11 Pigmente, dem HCl zugesetzt wurde, zeigt im Vergleich zum Referenzspektrum ohne HCl deutliche Unterschiede. Im angesäuerten Spektrum sind die Peaks bei 434 nm und 622 nm deutlich verkleinert. Die ST3-L und ST3-H Pigmente zeigen in den angesäuerten Spektren keine Unterschiede zu den Referenzspektren.

Die bei der Trennung von ST3 Pigmenten aus Kulturüberständen mittels Säulenchromatographie gesammelten Fraktionen ergaben bei einer DC die in Abbildung 21 gezeigten Banden. Am deutlichsten sichtbar sind die in den Fraktionen 3-5 enthaltenen Banden. In Fraktion 1 ist eine schwach grüne sowie eine fluoreszierende Bande zu erkennen. Eine noch schwächere grüne Bande auf derselben Höhe wie in Fraktion 1 und eine mit lodfärbung nachweisbare Bande sind in Fraktion 2 zu finden. Eine fluoreszierende und zwei schwach grüne Banden, die farblich nicht zu unterscheiden sind, zeigt Fraktion 3. In Fraktion 4 ist deutlich eine obere, hellgrüne Bande, eine langsamer laufende dunkelgrüne Bande und eine



Abb. 20: 2D-DC isolierter BChl-Vorstufen von *R. rubrum* ST3 und GN11 aus Kulturüberständen (M2SF+-Medium). DC-Platten: Kieselgel, Laufmittel 1. Dimension: DCM/ MeOH/ H_2O , Laufmittel 2. Dimension: MeOH/ Aceton/ H_2O . F = Bande nur mit UV-Licht sichtbar

Abb. 21: DC der Fraktionen (1-6) der Säulenchromatographie (Kieselgel 60, Laufmittel: DCM/ MeOH) von isolierten BChl-Vorstufen aus dem Kulturüberstand von *R. rubrum* ST3, einer M2SF+-Kultur. DC-Platte: Kieselguhr/ Kieselgel Laufmittel: DCM/ MeOH/ H₂0 (85/ 30/ 5)

(v/v/v). I = mit lodfärbung sichtbare Bande, W = ochr ochwache Bande, E = mit LiV

W = sehr schwache Bande, F = mit UV-Licht sichtbare Bande.





Abb. 22: Absorptionsspektren der Fraktionen (1-6) der Säulenchromatographie (Kieselgel 60, Laufmittel: DCM/ MeOH) von isolierten BChl-Vorstufen aus dem Kulturüberstand von ST3 (M2SF+-Medium).

untere schwach grüne Bande zu sehen. Dieselben Banden wie in Fraktion 4 sind etwas schwächer auch in Fraktion 5 zu erkennen. Eine einzige, nur in der lodfärbung sichtbare Bande auf Höhe der dunkelgrünen Bande in Fraktion 4 und 5, zeigt sich in Fraktion 6.

Absorptionsspektren der einzelnen Fraktionen der Säulenchromatographie mit ST3 Pigmenten sind in Abbildung 22 dargestellt. Die Spektren zeigen, dass die Fraktionen 1, 2, 3 und 6 relativ wenig Pigment enthalten. Im Spektrum der Fraktion 4 zeigen sich Peaks bei 407 nm, 505 nm, 536 nm, 606 nm und 660 nm, die mit den Peaks im Spektrum der ST3-L Bande vergleichbar, aber um 1 nm – 3 nm rot verschoben sind. Die ST3 Pigmente der Fraktion 4 der Säulenchromatographie wurden zur massenspektroskopischen-Analyse gegeben (vgl. Anhang 1.4). Das Spektrum der Fraktion 5 zeigt die gleichen Peaks wie das Spektrum der Fraktion 4. Die beiden Fraktionen zeigen unter dem 660 nm/ 661 nm Peak im längerwelligen Bereich noch eine zusätzliche Schulter, die den gesuchten Bchl-Vorstufen nicht zugeordnet werden kann. Aus der Fraktion 5 wurden mittels HPLC die auf der DC als hellgrüne Bande sichtbaren Pigmente aufgereinigt. Eine DC mit den gereinigten Pigmenten (ST3-5/667) und dem Ausgangsmaterial (ST3-5) ist in Abbildung 23 gezeigt. Die gereinigten Pigmente enthalten nur eine Bande, die auf der Höhe der hellgrünen Bande des Ausgangsmaterials läuft. Absorptionsspektren der bei der HPLC-Aufreinigung gesammelten Fraktionen zeigt Abbildung 24. Die Pigmente der ST3-5/667 Fraktion absorbieren mit einem Maximum bei 667 nm, der den Pigmenten der ST3-H Bande (hellgrüne Bande) zugeordnet werden kann. Die

Abb. 23: DC der Fraktion 5 (ST3-5) der Säulenchromatographie (Kieselgel 60, Laufmittel: DCM/ MeOH) von isolierten BChl-Vorstufen aus dem Kulturüberstand von *R. rubrum* ST3 (M2SF+-Medium) und der durch HPLC gereinigten Fraktion ST3-5 (ST3-5/667).

DC-Platte: Kieselguhr/ Kieselgel, Laufmittel: DCM/ MeOH/ H_20 (85/ 30/ 5) (v/ v/ v).





Abb. 24: Absorptionsspektren der HPLC-Fraktionen ST3-5/667 und ST3-5/660 aus der Aufreinigung der Fraktion 5 (Säulenchromatographie). Das Spektrum der Fraktion ST3-5/660 zeigt Peaks bei 408 nm, 504 nm, 535 nm, 606 nm, 660 nm und 686 nm, das der Fraktion ST3-5/667 bei 408 nm, 507 nm, 535 nm, 613 nm und 667 nm.

Fraktion ST3-5/660 zeigt einen charakteristischen Peak bei 660 nm, der der ST3-L Bande (dunkelgrüne Bande) entspricht (vgl. Abb. 26). Die gereinigten ST3-5/667 Pigmente wurden massenspektroskopisch weiter analysiert (siehe Anhang 1.5).

Eine Gauss-Analyse der Absorptionsspektren der beiden bei der Reinigung mittels HPLC gesammelten Fraktionen ist in Abbildung 25 gezeigt. Die Analyse der Fraktion 1 ergibt die genaue Lage des charakteristischen Peaks bei 660 nm und ermöglicht die Beschreibung der Hauptkomponenten mittels einzelner Gauss-Kurven. Diese weisen darauf hin, dass die Probe der P660 Pigmente nur noch geringe Verunreinigung mit weiteren Pigmenten aufweist. Dasselbe gilt für die Analyse des Spektrums der Fraktion 2 (ST3-5/667), für die sich die genaue Lage des charakteristischen Peaks bei 667 nm ergibt, und bei der es sich ebenfalls um eine weitestgehend reine Probe handelt.



ST3 667



Abb. 25: Gauss-Analyse der Absorptionsspektren von HPLC-Fraktionen der Aufreinigung von ST3-5/667 aus der Fraktion 5 (Säulenchromatographie). Spektrum der Fraktion 1 (A) mit charakteristischem Peak bei 660 nm, Fraktion 2 (B) mit charakteristischem Peak bei 667 nm.

5.3.2 Bakteriochlorophyllvorstufen von Chromatophoren

BChl-Vorstufen, die aus *R. rubrum* ST3 und GN11 Chromatophoren isoliert wurden, weisen im Dünnschichtchromatogramm die in Abbildung 26 gezeigten Banden auf. Pigmente von GN11 weisen eine sehr kräftige, grüne Bande und eine schwache, kaum sichtbare grüne Bande darunter auf. Aus ST3 Chromatophoren extrahierte Pigmente zeigen ebenfalls zwei Banden, wobei die obere Bande eine hellgrüne Farbe und die etwas langsamer laufende Bande eine dunkelgrüne Farbe besitzen. Diese Ergebnisse entsprechen denen von Dünnschichtchromatogrammen von ST3 und GN11 Pigmenten aus dem Kulturüberstand.

Die isolierten BChl-Vorstufen von ST3 zeigen im Absorptionsspektrum einen charakteristischen Peak bei 661 nm (Abb. 27), der mit dem von ST3 ins Kulturmedium abgegebenen Pigmenten übereinstimmt. Auch die übrigen Peaks des Spektrums stimmen mit den vergleichbaren Peaks überein oder sind wie in zwei Fällen um 1 nm rot verschoben. GN11 Pigmente zeigen einen charakteristischen Peak bei 631 nm. Die Peaks der GN11 Pigmente weisen eine Übereinstimmung mit denen der Spektren von ins Kulturmedium ausgeschiedenen Pigmenten auf.

Das HPLC-Chromatogramm der aus Chromatophoren isolierten ST3 Pigmente in Abbildung 28 zeigt zwei Hauptkomponenten mit einer Retentionszeit

Abb. 26: DC isolierter BChl-Vorstufen von *R. rubrum* ST3 und GN11 Chromatophoren. Von beiden Stämmen wurden je 20 μ l Probe aufgetragen. Die DC wurde mit CHCl₃/ MeOH/ H₂0 als Laufmittel entwickelt.



von 3,5 min und 7,2 min. Mit Hilfe von Absorptionsspektren konnten diese den zwei Pigmenten ST3-660 und ST3-667 zugeordnet werden. Das Pigment ST3-660 entspricht der unteren, dunkelgrünen Bande im Dünnschichtchromatogramm (Abb. 26) und dem ersten Peak mit einer Retentionszeit von 3,5 min im HPLChellgrünen Pigmente Chromatogramm. Die der oberen Bande im HPLC-Chromatogramm Dünnschichtchromatogramm können im als zweite Hauptkomponente mit einer Retentionszeit von 7,2 min beobachtet werden und entsprechen dem Pigment ST3-667. Das HPLC-Chromatogramm der GN11 Pigmente zeigt 3 Hauptkomponenten. Diese weisen Retentionszeiten von 9,6 min, 10,7 min und 13,6 min auf.

Die Absorptionsspektren der Fraktionen ST3-660 und ST3-667 zeigt Abbildung 29. Die in der Fraktion ST3-660 enthaltenen Pigmente zeigen Peaks bei 408 nm, 505 nm, 538 nm, 552 nm, 606 nm und 660 nm, die der Fraktion ST3-667 bei 413 nm, 507 nm, 538 nm, 552 nm 608 nm und 667 nm. Das Spektrum der Fraktion ST3-660 stimmt im charakteristischen Peak bei 660 nm und der Soret-



Abb. 27: Absorptionsspektren von isolierten BChl-Vorstufen, isoliert aus ST3- (schwarz) und GN11-Chromatophoren (grau), gelöst in 600 µl MeOH. Das Spektrum von ST3 zeigt Maxima bei 325 nm, 407 nm, 505 nm, 536 nm, 605 nm und 661 nm, das von GN11 Maxima bei 419 nm, 531 nm, 573 nm und 631 nm.



Abb. 28: HPLC-Chromatogramme isolierter BChl-Vorstufen von aus ST3 (A) und GN11 (B) Chromatophoren. Puffer: MeOH/ Aceton/ H_20 (gestrichelte Linie), MeOH/ H_20 (gepunktete Linie). In (A) rechts oben: Zuordnung der ST3-660 und ST3-667 Absorptionsspektren. Injektion der Proben erfolgte zum Zeitpunkt t = 10 min.

Bande mit dem Spektrum der aus dem Kulturüberstand isolierten Pigmente ST3-5/660 überein. Im ST3-660 Spektrum findet sich ein Peak bei 552 nm, der im ST3-5/660 Spektrum nicht nachzuweisen ist. Der Peak bei 505 nm ist im Vergleich zu ST3-5/660 um 1 nm blau, der Peak bei 538 nm um 3 nm rot verschoben. Das ST3-5/660 Spektrum zeigt hingegen einen überlagerten Peak bei ca. 686 nm der im Spektrum der ST3-660 Pigment wesentlich weniger ausgeprägt vorhanden ist. Die ST3-667 Pigmente stimmen im charakteristischen Peak bei 667 nm mit dem Spektrum der ST3-5/667 Pigmente überein. Der im ST3-660 Spektrum bei 552 nm sichtbare Peak ist auch im ST3-667 Spektrum sichtbar, fehlt aber im Spektrum der ST3-5/667 Pigmente. Die weiteren Peaks im ST3-667 Spektrum stimmen mit den vergleichbaren Peaks im ST3-5/667 Spektrum überein oder sind um 1 bis 5 nm rot verschoben.

Eine Gauss-Analyse der Absorptionsspektren der Pigmente ST3-660 und ST3-667, isoliert von Chromatophoren und gereinigt mittels HPLC zeigt Abbildung 30. Das Pigment ST3-660 zeigt einen charakteristischen Peak bei 660 nm. Auch die übrigen ermittelten Gauss-Kurven dieses Pigments stehen in guter Übereinstimmung mit den vergleichbaren Kurven im ST3-660 Pigment aus Kultur-



Abb. 29: Absorptionsspektren der HPLC-Fraktionen ST3-660 und ST3-667 von der Aufreinigung von an ST3 Chromatophoren gebundenen Pigmenten. Das Spektrum der Fraktion ST3-660 zeigt Peaks bei 408 nm, 505 nm, 538 nm, 552 nm, 606 nm und 660 nm, das der Fraktion ST3-667 bei 413 nm, 507 nm, 538 nm, 552 nm 608 nm und 667 nm.





Abb. 30: Gauss-Analyse der Absorptionsspektren der HPLC-Fraktionen der Aufreinigung von an *R. rubrum* ST3 Chromatophoren gebundenen Pigmente. Spektrum der Fraktion 1 (A) mit charakteristischem Peak bei 660 nm, Fraktion 2 (B) mit charakteristischem Peak bei 667 nm.

überständen, und bestätigt, dass es sich bei den beiden um dieselben Pigmente handelt. Für das Pigment ST3-667 ergab die Analyse einen charakteristischen Peak bei 667 nm, ebenfalls in guter Übereinstimmung mit der Analyse des ST3-667 Pigmentes aus Kulturüberständen. Die weiteren Gauss-Kurven der Analyse der beiden Pigmente bestätigen auch in diesem Fall, dass es sich bei den aus Kulturüberständen und ICMs isolierten ST3-667 Pigmente um dasselbe Pigment handelt. Die Gauss-Analyse der aus ICMs isolierten und gereinigten Pigmente bestätigt in beiden Fällen die geringe Verunreinigung der Proben mit weiteren Pigmenten.

5.3.3 Massenspektroskopie

Ergebnisse der Massenspektroskopischen Analyse sind in Anhang 1 gegeben. Die von einer DC-Platte isolierten Pigmente von GN11 zeigten im MS-Chromatogramm eine Vielzahl an Fragmenten in geringen Mengen zwischen 400 m/z und 700 m/z. Zwei Fragmente (647,2 m/z und 663,3 m/z) sind in größeren Mengen vorhanden. Dasselbe Ergebnis zeigen Analysen der von einer DC-Platte isolierten ST3-H-Bande. Die ST3-L-Bande, die von einer DC-Platte isoliert wurde, zeigt Fragmente bei 647,2 m/z und 662,4 m/z sowie eine Vielzahl weiterer Fragmente in kleineren Mengen. Im Massenspektrogramm der ST3-5/667 Probe zeigen sich Fragmente zwischen 500 m/z und 600 m/z in relativ großen Mengen. Ein stärkeres Signal ist bei 663,4 m/z vorhanden. In etwas geringeren Mengen finden sich auch die Fragmente mit 647,2 m/z und 662,4 m/z. Die ST3-Pigmente der Fraktion 4 der Säulenchromatographie zeigen im Massenspektrogramm keine eindeutigen Peaks. Es findet sich eine große Zahl unterschiedlicher Fragmente in vergleichsweise geringer Konzentration.

6. Diskussion

In den vergangenen 50 Jahren wurden enorme Fortschritte im Verständnis der BChl-Biosynthese gewonnen, vor allem durch Untersuchungen an Mutanten (Jones, 1963a, 1963b, 1963c, 1964; Lascelles, 1966; Lascelles & Altshuler, 1967; Richards & Lascelles, 1969; Oelze & Drews, 1970; Pudek & Richards, 1975; Pradel & Clement Metral, 1976; Yang & Bauer, 1990; Burke et al., 1993a; Suzuki & Bauer, 1995; Addlesee & Hunter, 2002), unterschiedlicher Mikroorganismen, die im Biosyntheseweg unterbrochen waren. Ein Großteil dieser Arbeiten wurden in Rb. sphaeroides und Rb. capsulatus getätigt, von denen schon nach wenigen Jahren eine ganze Reihe unterschiedlicher BChl-Defizienter Stämme zur Verfügung standen. Für diese beiden Organismen sind inzwischen weitgehend akzeptierte BChl-Biosynthesewege postuliert worden. Nur unzureichend verstanden sind bisher die durch die in bchE und bchXYZ kodierten Enzyme katalysierten Schritte. Auch die genaue Lokalisierung der BChl-Vorstufen während und zwischen den einzelnen Syntheseschritten ist bis heute nicht verstanden. Fraglich ist, ob die Pigmente frei diffundieren oder an Proteine oder in Membransystemen gebunden sind. Bisher konnte die Idee eines Transportproteins für BChl-Vorstufen von Lascelles (1966) nicht eindeutig nachgewiesen werden. Pigment-Proteinkomplexe wurden bis jetzt nur aus dem Kulturmedium oder aus der äußeren Membran isoliert. Aus Chromatophoren, in denen auf jeden Fall ein Teil der Pigmente gebunden ist, wie Absorptionsspektren gezeigt haben, konnten bisher von anderen Autoren keine Pigment-Proteinkomplexe isoliert werden. Für einzelne Schritte des Syntheseweges (BchXYZ, BchE) fehlen noch immer die Nachweise einer in vitro Aktivität, auch wenn aufgrund von Homologieanalysen und Untersuchungen der Mutantenstämme inzwischen relativ klare Vorstellungen über Substrate und Reaktionsmechanismen bestehen. Auch für R. rubrum stehen eine Reihe BChl-Mutanten zur Verfügung, die es ermöglichen die oben adressierten Fragestellungen zu untersuchen (Ghosh, unveröffentlichte Daten; Sägesser, 1992). Besonders hilfreich ist in diesem Zusammenhang der Einsatz der für R. rubrum entwickelten Hochzelldichtemedien (M2S, M2SF und M2SF+) (Ghosh et al., 1994), die zu einer erhöhten Produktion und Anhäufung von BChl, ICMs und ins Medium ausgeschieden BChl-Vorstufen führen. Dies ermöglicht die Untersuchungen von Pigmenten und Pigment-Protein-Komplexen, die bisher nicht möglich waren, da nicht genügend Ausgangsmaterial für Untersuchungen zur Verfügung stand.

Einer der bisher nur unzureichend verstandenen und untersuchten Schritte der BChl-Biosynthese ist der durch die Chlorophyllid-Reduktase (BchXYZ) katalysierte Schritt. Mit Hilfe des *R. rubrum* Stamms ST3, der einen grünen Phänotyp zeigt, konnte schon in Voruntersuchungen zu dieser Arbeit anhand von Spektren gezeigt werden, dass es sich bei den angehäuften BChl-Vorstufen vermutlich um ein Gemisch mehrerer Pigmente handelt. Die im Vergleich zu vorhergegangenen Studien wesentlich größeren Mengen an Pigmenten sollten eine Trennung und Identifizierung der angehäuften Pigmente sowie eine Lokalisierung ermöglichen. Dasselbe gilt für den Stamm GN11, der ebenfalls einen grünen Phänotyp zeigt und vermutlich ein Gemisch an verschiedenen BChl-Vorstufen anhäuft. Absorptionsspektren im Rahmen von Voruntersuchungen zur vorliegenden Arbeit weisen auch darauf hin, dass es sich bei diesem Stamm um eine *bchJ* Mutante handelt und nicht wie von Sägesser (1992) beschrieben um eine *bchB* Mutante. Gestützt wird diese Vermutung durch Komplementationsexperimente mit Plasmiden, die Gene der BChl-Synthese enthalten (Ghosh, unveröffentl. Daten).

Um Biosynthesewege und Signalkaskaden in Mikroorganismen zu untersuchen, werden üblicherweise Mutantenstämme eingesetzt, in denen der zu untersuchende Syntheseweg oder Kaskade unterbrochen sind oder durch Expression die Konzentration einzelner Proteine oder Faktoren künstlich erhöht oder erniedrigt werden. Dies hat in der Regel nicht nur Auswirkungen auf den betreffenden Syntheseweg oder Signalkaskade, sondern auch auf das Wachstum der Mikroorganismen. Daher können veränderte Bakterienstämme mit Hilfe von Wachstumskurven charakterisiert werden. Wie die Ergebnisse unter 5.1 zeigen, ist für den R. rubrum Stamm ST3 im Vergleich zum Wildtyp (S1) kein Unterschied im Wachstum unter semiaeroben Bedingungen bei 30°C im Dunkeln auf Basis der Trübungsmessungen (660 nm) zu erkennen. Die Insertion des Tn5-Elements in die Region des bchCXYZ-Clusters von ST3 scheint somit keinen Einfluss auf das Wachstum unter diesen Bedingungen zu haben. Allerdings ist eine Veränderung bei der Produktion oder der Zusammensetzung der spezialisierten pigmenthaltigen Membranen in ST3 zu erwarten. Die BChl-Konzentration für R. rubrum in vivo kann nach Holt & Marr (1965) bei 880 nm bestimmt werden und ist direkt proportional zur Menge an photosynthetischen Membranen in den Zellen. Es kann gezeigt werden, dass beim ST3-Stamm die Bildung von spezialisierten pigmenthaltigen Membranen um etwa die Hälfte im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist. Beim Wildtypstamm nimmt die Menge der photosynthetischen Membranen nach Ablauf der "lag" Phase stetig zu. Die Mutante zeigt keine Zunahme der Menge an pigmenthaltigen Membranen (bestimmt bei 880 nm) in Bezug auf die Zunahme der Zellmasse während beim Wildtyp eine Zunahme zu verzeichnen ist. Die Bestimmung der Menge von photosynthetischen Membranen auf der Basis der Messungen bei 880 nm setzt voraus, dass eine vollständige Bakteriochlorophyllsynthese und die Bildung von Lichtsammelkomplexen gegeben sind. Bei der ST3-Mutante ist die Produktion von BChl durch die Insertion des Tn5-Elements unterbrochen, und die Zellen häufen eine BChl-Vorstufe an, die im Spektrum der Zellen einen

charakteristischen Peak bei 663 nm zeigt. Wird die Produktion an spezialisierten pigmenthaltigen Membranen in beiden Stämmen bei 667 nm gemessen, so erreicht der ST3 Stamm rund 80% des für den Wildtyp gemessenen Wertes (Abb. 5). Eine genaue Quantifizierung ist schwierig, da die beiden gemessenen Wellenlängen sehr nahe beieinander liegen. Die Kultivierung von R. rubrum in Medien, die zu einer höheren Ausbeute von spezialisierten pigmenthaltigen Membranen führen (Ghosh et al., 1994), zeigt auch im Fall von ST3 einen positiven Effekt (Abb. 6). Im Vergleich zum M2S-Medium erreicht ST3 im M2SF-Medium eine höhere Zelldichte und größere Mengen an pigmenthaltigen Membranen. Im Verhältnis 880 nm/ 660 nm ist jedoch kein Unterschied zwischen den beiden Medien erkennbar, was auf die oben genannten Gründe zurückzuführen ist.

Absorptionsspektren von Kulturen, Zellen und Kulturüberständen zeigen die charakteristischen Peaks der beiden Stämme. Der Wildtyp zeigt einen Peak bei 880 nm, der das Vorhandensein von BChl und intakten Reaktionszentren anzeigt. Das Spektrum des Kulturüberstandes weist darauf hin, dass nur geringe Mengen an Pigmenten in das Medium ausgeschieden werden. Im Gegensatz dazu werden bei ST3 Pigmente in das Medium abgegeben, so dass ein Peak bei 672 nm beobachtet werden konnte. Die Zellen von ST3 zeigten einen Peak bei 663 nm in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Coomber *et al.* (1990) und Hunter *et al.* (1991) für eine *Rb. sphaeroides* Mutante, die ebenfalls ein Tn5-Element im *bchXYZ* Cluster enthält.

Die eingesetzten Medien beeinflussen nicht nur die erreichte Zelldichte und die Produktion von spezialisierten pigmenthaltigen Membranen, sondern im Fall von ST3 auch die in das Medium ausgeschiedenen BChI-Vorstufen (Abb. 8). Während in Kulturüberständen von ST3, bei Wachstum in M2S- oder M2SF-Medium zwei Peaks bei 650 nm und 671 nm zu beobachten sind, zeigen M2SF+-Kulturüberstände nur einen Peak bei 679 nm. Entweder werden in den ersten beiden Fällen zwei unterschiedliche BChI-Vorstufen ausgeschieden oder es handelt sich bei P650 um ein Abbauprodukt von P671. Die höhere Produktion an pigment-haltigen Membranen von in M2SF+-Medium kultivierten ST3-Zellen könnte auch die Produktion der BChI-Vorstufen beeinflussen, und zur Ausscheidung nur einer Vorstufe, oder einer Veränderten Stabilität im Kulturüberstand führen. Es ist anzunehmen, dass es sich bei den P671- und P679-Vorstufen um dasselbe Pigment handelt, da die Messungen ganzer Kulturen, Zellen und der Kulturüberstände zeigt, dass es in M2SF+-Medium zu einer Rotverschiebung der beobachteten Peaks im Vergleich zu M2S- und M2SF-Medien kommt.

Aus den intracytoplasmatischen Membranen der beiden Stämme ST3 und GN11 konnten Protein-Pigment-Komplexe isoliert werden (Abb. 10, Abb. 11). Schon in einem früheren Modell von Lascelles (1966) und Lascelles & Altshuler

(1967) wurde ein membrangebundenes Trägerprotein vermutet, das nicht kovalent mit den Intermediaten des BChl-Syntheseweges assoziiert ist. Dieses Modell wurde zum Teil durch spätere Arbeiten unterstützt, bei denen man in Mutanten, die im BChl-Biosyntheseweg unterbrochen ins Medium ausgeschiedene waren, Tetrapyrrolintermediate als hochmolekulare Protein-Lipid-Kohlenhydrat-Komplexe nachweisen konnte (Oelze & Drews, 1970; Drews et al., 1971; Drews, 1974; Richards et al., 1975; Pradel & Clement Metral, 1976; Bollivar & Bauer, 1992). Die SDS-PAGE der von ST3 und GN11 mit 8 mM bzw. 16 mM DHPC isolierten Protein-Pigmentkomplexe enthalten jeweils 9 Proteine, die sich allerdings in ihren Größen unterscheiden (Abb. 11). Sofern sich darunter das gesuchte Trägerprotein befindet, sollte es in allen vier Proben zu finden sein. Hierfür kommen nur drei Banden bei 31/33 kDa, 17 kDa und 15 kDa in Frage. Bei den übrigen Banden könnte es sich um Proteine bzw. Proteinkomplexe handeln, die im BChl-Biosyntheseweg involviert sind. Die 60 kDa Bande in der ST3 Probe könnte aufgrund der Größe BchB oder BchE zugeordnet werden. Im Biosyntheseweg von BChl fungieren BchB, BchL und BchN als Protochlorophyllidreduktase (Abb. 1). Die 31 kDa Bande könnte dem BchL Genprodukt zugeordnet werden, allerdings findet sich keine Bande die dem BchN Genprodukt zugeordnet werden kann. Es ist daher fraglich, ob es sich bei den beiden Banden (60 kDa, 31 kDa) um die Genprodukte von BchB und BchL handelt und die dritte Untereinheit des Komplexes bei der Extraktion abgelöst wurde. Die 31 kDa Bande könnte auch der Geranylgeranyl-Bakteriochlorophyllsynthetase (BchG) zugeordnet werden. Die 54 kDa Bande von ST3 ließe aufgrund ihrer Größe eine Zuordnung zu BchZ bzw. BchD zu. Da es sich bei ST3 um eine Tn5 Mutante mit Insertion im bchCXYZ Gencluster handelt und keine Banden zu erkennen sind, die den Genprodukten von bchC, bchX und bchY entsprechen, ist anzunehmen, dass es sich bei der 54 kDa Bande nicht um BchZ handelt. Die Magnesium-Protoporphyrin-IX-Chelatase wird durch die Genprodukte BchD, BchI und BchH gebildet. Da sich keine Banden im Gel finden, die Bchl und BchH zugewiesen werden können, ist es eher unwahrscheinlich, dass es sich bei der 54 kDa Bande um BchD handelt. Dies ist aber nicht mit Sicherheit auszuschließen. Es wird angenommen, dass ein solcher Enzymkomplex aus drei Untereinheiten relativ stabil sein sollte, so dass in einer Isolation nicht nur einer der Komplexe zu finden ist und die anderen beiden während der Isolation abgelöst wurde. Für die 4-Vinyl-Reduktase (BchJ) wäre eine Größe von 22 kDa zu erwarten, was in Übereinstimmung mit der gefundenen Bande stehen würde. In derselben Bande könnte sich auch BChF finden. Den übrigen Banden von ST3 kann aufgrund der Größe kein Protein des BChl-Syntheseweges zugeordnet werden. In den GN11 Proben könnte die als 23 kDa identifizierte Bande der 4-Vinyl-Reduktase (BchJ) zugeordnet werden. Die 31/33/35 kDa Banden könnten BChC, BChX, BChG und/

Gen	Enzym	kDa
bchH	Mg-Protoporphyrin-IX-Chelatase (Untereinheit H)	134,8
bchE	Mg-Protoporphyrin-IX-Monomethylester Oxidative Cyclase	61,3
bchB	Protochlorophyllide-Reduktase (Untereinheit B)	58,3
bchD	Mg-Protoporphyrin-IX-Chelatase (Untereinheit D)	52,7
bchZ	Chlorophyllide-Reduktase (Untereinheit Z)	52,4
bchY	Chlorophyllide-Reduktase (Untereinheit Y)	48,4
bchN	Protochlorophyllide-Reduktase (Untereinheit N)	47,8
bchP	Geranylgeranyl-Bakteriochlorophyll-Reduktase	43,7
bchl	Mg-Protoporphyrin-IX-Chelatase (Untereinheit I)	42,1
bchC	2-Hydroxyethyl-Bakteriochlorophyllid-Dehydrogenase	33,8
bchX	Chlorophyllide-Reduktase (Untereinheit X)	33,7
bchG	Geranylgeranyl-Bakteriochlorophyll-Synthase	32,2
bchL	Protochlorophyllide-Reduktase (Untereinheit L)	32,1
bchM	Mg-Protoporphyrin-Methyltransferase	25,8
bchJ	4-Vinyl-Reduktase	22
bchF	2-Vinyl-Bakteriochlorphyllid-Hydratase	20,8

Tab. 5: Gene und Genprodukte des BChl-Biosyntheseweges in R. rubrum

oder BChL zugeordnet werden. Da aus den zuvor genannten Gründen bei der Zuordnung der Banden zu Genprodukten des BChl-Syntheseweges jene Proteine ausgeschlossen wurden, die aus mehreren Untereinheiten bestehen und für die sich auf den Gelen nicht die Banden aller Untereinheiten finden, wurden auch bei GN11 die Zuordnungen von BchLNB und BchXYZ verworfen. So bleiben einzig die 33 kDa und 31 kDa Banden, denen aufgrund der Größe die Genprodukte von *bchC* und *bchG* zugeordnet werden könnten. Aufgrund der vorliegenden Daten kann aber keine eindeutige Zuordnung der einzelnen Banden zu Enzymen des BChl-Syntheseweges getroffen werden, so dass die genannten Zuordnungen und Ausschlüsse nur als erste Hinweise zur Lösung der Fragestellung auf der Suche nach den pigmentassoziierten Proteinen gelten können.

Von Oelze & Drews (1970) wurden Pigment-Proteinkomplexe einer *R. rubrum* Mutante aus dem Kulturmedium mit Tween 80 isoliert, die die beiden BChl-Vorstufen Phaeophorbid a und 2-Devinyl-2- α -Hydroxyethyl-Phaeophorbid a gebunden hatten. Das Molekulargewicht der Proteine im Proteinpigmentkomplex wurde zu 16,5 kDa, 32 kDa und 65 kDa bestimmt, wobei es sich bei den beiden letzten um Dimere und Tetramere der kleinsten Untereinheit (16,5 kDa) handeln sollte. Dies wäre in guter Übereinstimmung mit der 17 kDa Bande die sich in allen vier Proben (ST3 und GN11) findet. Allerdings gilt es hier zu beachten, dass es sich bei den in ST3 und GN11 gefundenen Proteinen, nicht um ins Kulturmedium

ausgeschiedene, sondern um aus ICMs isolierte Proteine handelt. Pradel & Clement-Metral (1976) isolierten aus einer Mutante von Rb. spheroides aus dem Kulturmedium Protein-Pigmentkomplexe ohne Verwendung von Detergenzien, die die BChl-Vorstufe 4-Vinyl-Protochlorophyllid a gebunden hatten, und bestimmten das Molekulargewicht des Komplexes mittels Gelfiltration auf 130 kDa. Angaben zur Größe der Untereinheiten des gefundenen Komplexes fehlen allerdings. Bollivar & Bauer (1992) isolierten aus Rb. capsulatus mit LDAO (Lauryldimethylaminoxid) Pigment-Proteinkomplexe aus dem Kulturmedium und aus äußeren Membranen von Rb. capsulatus und fanden die Pigmente in beiden Fällen an dasselbe 32 kDa-Protein gebunden, das sie als das Hauptporin der äußeren Membran von Rb. capsulatus identifizierten. Hierbei handelt es sich vermutlich um ein Artefakt. Das Hauptporin der äußeren Membran von R. rubrum weist eine Größe von 37,5 kDa auf. Eine entsprechende Bande findet sich nicht auf den Gelen von ST3 und GN11, so dass die vorliegenden Daten eine Bindung der Pigmente in ST3 und GN11 an dieses Protein ausschließen. Zuvor hatte Drews (1974) gezeigt, dass die Protein-Pigmentkomplexe im Kulturmedium von Rb. capsulatus nicht nur das 32 kDa Protein enthalten, sondern 5 weitere Proteine unterschiedlicher Größe mit dem Komplex assoziiert sind (isoliert mit Tween). Die in dieser Arbeit gefundenen Daten weisen darauf hin, dass die Pigment assoziierten Proteine in den ICMs von R. rubrum zu einer Art Superkomplex verbunden sein könnten, die auch Enzyme des BChl-Syntheseweges enthalten.

Absorptionsspektren der isolierten Protein-Pigmentkomplexe haben gezeigt, dass die mit 8 mM bzw. 16 mM DHPC isolierten Proben von ST3 dieselben BChl-Vorstufen enthalten (Abb. 12). Auch bei der Isolation von Protein-Pigmentkomplexen aus GN11 wurde dieses Ergebnis erreicht. In beiden Fällen lassen sich bereits mit 8 mM DHPC Protein-Pigmentkomplexe aus den Membranen isolieren, jedoch sind höhere Konzentrationen bis zu 16 mM DHPC nötig, um den größten Teil der Protein-Pigmentkomplexe aus der Membran zu lösen. Neben den grüngefärbten Banden findet sich bei der Isolation der Protein-Pigmentkomplexe über Saccharose-Gradienten auch eine braun-gefärbte Fraktion. Auch Oelze & Drews (1970) beobachteten eine farblose bis braun-gefärbte Fraktion bei der Isolation der Protein-Pigmentkomplexe (ohne Verwendung von Detergenz). Sowohl bei diesen Autoren wie auch in dieser Arbeit wurden keine weiteren Untersuchungen zur Identifizierung der enthaltenen Proteine und Pigmente dieser Fraktion durchgeführt.

Nah-IR-CD-Spektren der isolierten Protein-Pigmentkomplexe von ST3 und GN11 zeigten keine Unterschiede zwischen den mit 8 mM und 16 mM DHPC isolierten Proben (Abb. 14). Dies deutet darauf hin, dass sich in beiden Proben dieselben Komplexe befinden und sich die Pigmente in beiden Fällen in derselben Proteinumgebung befinden. Der Vergleich von Nah-IR-CD-Spektren von Chromatophoren der beiden Stämme und Spektren der isolierten PigmentProteinkomplexe zeigten nur geringe Unterschiede (Abb. 13). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich die Lage oder Orientierung der Pigmente in den Komplexen während der Isolation geringfügig verändert hat oder sich ein Teil der gebundenen Pigmente gelöst hat. Eine Erklärung könnte auch eine geringfügige Konformationsänderung der Proteine oder der Verlust eines Proteins im Protein-Pigmentkomplex während der Isolation sein. Der Vergleich von Spektren von ST3und GN11-Chromatophoren aus unterschiedlichen Medien zeigt, dass Chromatophoren von Zellen aus M2SF+-Medium ein wesentlich stärkeres Signal als Chromatophoren von Zellen aus M2SF-Medium aufweisen. Dies dürfte auf die in M2SF+-Medium erhöhte Produktion von BChl und ICMs zurückzuführen sein. Im Vergleich der beiden Stämme zeigt ST3 sowohl bei den Chromatophoren, als auch bei den Protein-Pigmentkomplexen ein deutlich höheres Signal im CD-Spektrum. Die Chromatophoren und isolierten Protein-Pigmentkomplexe der beiden Stämme zeigen im CD-Spektrum deutliche Signale, die charakteristisch für den jeweiligen Stamm sind und sich deutlich voneinander unterscheiden.

Anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen der von *R. rubrum* F9 isolierten und mit Hilfe von Tween-gelösten Protein-Pigmentkomplexe beschreiben Oelze & Drews (1970) eine partikuläre Struktur. Ihren Angaben zufolge bilden die isolierten Komplexe fadenförmige Aggregationsformen. Dasselbe beobachteten Schick & Drews (1969) und Drews *et al.* (1971) für isolierte Protein-Pigmentkomplexe von *Rb. capsulatus*. Neben den beschriebenen partikulären Strukturen und fadenförmigen Aggregationsformen zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen von isolierten ST3 Protein-Pigmentkomplexen auch ringförmige Strukturen, die auf eine geordnete Struktur hinweisen (Abb. 15).

Bisher konnte nur für eine kleine Anzahl von Enzymen des BChl-Biosynthesewegs in vitro eine Aktivität nachgewiesen werden. Während für die Protochlorophyllid-Reduktase (BchLNB) ein solcher Nachweis in vitro durch die Umsetzung von Protochlorophyllid erfolgreich war (Fujita & Bauer, 2000), konnte die Aktivität der Chlorophyllid-Reduktase (BchXYZ) in vitro bisher nicht gezeigt werden. Die Untereinheiten dieser Enzyme, die durch die bchX und bchL Gene kodiert werden, weisen eine Verwandtschaft mit Nitrogenasen auf (Burke et al., 1993b; Burke et al., 1993c; Beale, 1999; Willows, 2003). Um die Aktivität der Chlorophyllid-Reduktase in vitro zu untersuchen, wurde daher ein Ansatz verwendet, der auf einem Nitrogenaseassay basiert. Da bei ST3 die Chlorophyllid-Reduktase blockiert ist, sollten sich die Vorstufen des im Syntheseweg vorausgehenden Schrittes anhäufen, die durch die Chlorophyllid-Reduktase in den Chromatophoren der GN11-Mutante in einer Mischung der isolierten Protein-Pigmentkomplexe beider Stämme umgesetzt werden können. Wenn also die Energie von ATP aus dem Reaktionsansatz durch die Protein-Pigmentkomplexe genutzt würde, könnte eine aus der ST3-Vorstufe neu gebildete, nachfolgende

BChl-Vorstufe mit einem charakteristischen Maximum bei ungefähr 720 nm nachgewiesen werden. Dies gelang nicht, wie die Absorptionsspektren in Abbildung 16 zeigen. Entweder ist nicht Energie der limitierende Faktor oder es fehlt eine wichtige Komponente im Reaktionsansatz. Allerdings zeigte sich in einem der Ansätze nach 120 min Inkubation ein Unterschied der Peaks bei 667 nm und 606 nm. Die Protochlorophyllid-Reduktase folgt im Biosyntheseweg dem Schritt, der durch die 4-Vinyl-Reduktase katalysiert wird, welche in GN11 blockiert ist. Da die Protochlorophyllid-Reduktase ebenfalls eine Verwandtschaft zu den Nitrogenasen aufweist, hätte auch dieses Enzym im verwendeten Ansatz Aktivität zeigen können. Dies hätte die Produktion von Chlorophyllid a zur Folge, welches bei 667 nm absorbiert, sofern Chlorophyllid a nicht weiter umgesetzt würde. Eine weitere Umsetzung ist nicht zu beobachten, da keine neuen Peaks im längerwelligen Bereich festzustellen sind. Wenn die Protochlorophyllid-Reduktase Aktivität zeigen würde, müssten aber auch die von GN11 angehäuften BChl-Vorstufen (Peak bei 633 nm) abnehmen. Dies ist nicht zu beobachten. Da nach zwei Stunden Inkubationszeit die Gesamtabsorption der Ansätze abgenommen hat, dürfte die Abnahme der Absorption eine Folge der ersten Messungen der Proben sein. Es ist bekannt, dass die angehäuften Vorstufen sehr lichtempfindlich sind (Lascelles & Altshuler, 1967). Somit konnte in vitro weder für die Chlorophyllid-Reduktase noch für andere Enzyme des BChl-Biosynthesewegs, die in den Protein-Pigmentkomplexen enthalten sind, eine Aktivität gezeigt werden.

Um die Biosynthese von Bakteriochlorophyll besser zu verstehen, wurde in den vergangenen 50 Jahren eine ganze Reihe an Untersuchung mit Mutantenstämmen durchgeführt. Rückschlüsse auf den Syntheseweg gaben die in das Kulturmedium ausgeschiedenen oder in den Zellen angehäuften BChl-Vorstufen (Jones, 1963a, 1963b, 1963c, 1964; Lascelles, 1966; Lascelles & Altshuler, 1967; Richards & Lascelles, 1969; Oelze & Drews, 1970; Pudek & Richards, 1975; Pradel & Clement Metral, 1976; Yang & Bauer, 1990; Burke et al., 1993a; Suzuki & Bauer, 1995; Addlesee & Hunter, 2002). Dies führte zu dem in Abbildung 1 gezeigten Modell des Biosyntheseweges von Bakteriochlorophyll (Suzuki et al., 1997; Beale, 1999; Willows, 2003). Das Absorptionspektrum der von ST3 in das Kulturmedium ausgeschiedenen BChl-Vorstufen (Abb. 7) ist nahezu identisch mit dem von Oelze & Drews (1970) beobachteten Spektrum der ins Kulturmedium ausgeschiedenen BChl-Vorstufen von R. rubrum F9. Für die Absorptionsspektren der von GN11 ausgeschiedenen BChl-Vorstufen finden der sich in Literatur keine übereinstimmenden Beobachtungen. Die Untersuchung der ausgeschiedenen BChl-Vorstufen mittels Dünnschichtchromatographie zeigte, dass es sich bei den von ST3 abgegebenen Pigmenten um zwei unterschiedliche BChl-Vorstufen handelt. Dasselbe wurde auch von Oelze & Drews (1970) für den Stamm F9

beschrieben. Für GN11 deuteten die DC-Untersuchungen auf das Vorhandensein nur einer Vorstufe hin. Für beide Stämme ergaben auch 2D-DC-Analysen keine neuen Erkenntnisse (Abb. 20). Die DC-Analysen deuteten darauf hin, dass es sich bei den ausgeschiedenen BChl-Vorstufen um dieselben Vorstufen handelt, die auch in den Chromatophoren gebunden vorliegen. Für ST3 konnte dies eindeutig in den Absorptionsspektren der aus dem Kulturmedium und aus Chromatophoren isolierten BChl-Vorstufen gezeigt werden (Tab. 5). Mit Hilfe der Absorptionsspektren gelang auch die Identifizierung der ausgeschiedenen Pigmente. Bei den als ST3-5/660 und ST3-660 bezeichneten Vorstufen handelt es sich um 2-Devinyl-2-α-Hydroxyethyl-Phaeophorbid a. Im Spektrum der ST3-5/660 Probe zeigt sich eine Schulter bei ca. 686 nm, die vermutlich auf das Oxidationsprodukt von 2-Devinyl-2-α-Hydroxyethyl-Phaeophorbid a zurückzuführen ist (Jones, 1964). Die als ST3-5/667 und ST3-667 bezeichneten Vorstufen konnten als Phaeophorbid a identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um das Magnesiumfreie Derivat von Chlorophyllid a. Die Identifizierung von Phaeophorbid a wird durch das Fluoreszenzspektrum dieser Komponente bestätigt (Abb. 18). Belanger et al. (1982) beschreiben für das Magnesiumfreie Derivat des Chlorophyllid ein Emissionsmaximum bei 671 nm, welches in guter Übereinstimmung mit den vorliegenden Beobachtungen steht. Die Absorptionsspektren der angesäuerten ST3 Pigmente bestätigen, dass es sich um die Magnesiumfreien Formen der ermittelten Pigmente handelt (Abb. 19). Das Fluoreszenzspektrum der GN11 Pigmente zeigt zwei große Maxima, wobei der Peak bei 661 nm eine asymmetrische Form aufweist. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei der untersuchten Probe um ein Gemisch unterschiedlicher BChl-Vorstufen handelt. Der Peak bei 624 nm weist auf das Vorhandensein von Monovinyl- oder Divinyl-Protochlorophyllid hin (Belanger et al., 1982). Da es sich bei GN11 vermutlich um eine Mutante der 4-Vinyl-Reduktase (bchJ) handelt, würde dies für die Anhäufung von Divinyl-Protochlorophyllid (Magnesium 2,4 – Divinylphaeoporphyrin a_5 Monomethylester) sprechen. Die Absorptionsspektren der angesäuerten GN11 Pigmente bestätigen. dass

Pigment			λ _{max} [nm]				Referenz
ST3-5/660	408	504	535		606	660	
ST3-660	408	505	538	552	606	660	
2-Devinyl-2-α-							
hydroxyethyl-	406	503	532	554	603	659	(Oelze & Drews, 1970)
phaeophorbid a							
ST3-5/667	408	507	535		613	667	
ST3-667	413	507	538	552	608	667	
Phaeophorbid a	408	507	534	555	609	667	(Richards & Lascelles, 1969)

Tab. 6: Absorptionsmaxima der ST3 BChl-Vorstufen und Referenzspektren

mindestens eines der enthaltenen Pigmente Magnesium gebunden hat (Abb. 19). Dies würde auch durch die Beobachtungen von Jones (1963b) und Lascelles (1966) gestützt. Dagegen sprechen die Beschreibungen von Absorptionsspektren des Divinyl-Protochlorophyllid von Belanger & Rebeiz (1980) und Jones (1963c), die 623/624 nm als charakteristischen Peak des Pigments nennen. Fasst man diese Beobachtungen zusammen, so kann für GN11 keine eindeutige Zuordnung des angehäuften Pigments getroffen werden, doch ist zumindest eine Anhäufung des Divinyl-Protochlorophyllid anzunehmen. Die Analyse der GN11 Pigmente mittels HPLC bestätigt die Vermutung der Fluoreszenzspektren, dass es sich um ein Gemisch unterschiedlicher BChl-Vorstufen in der untersuchten Probe handelt (Abb. 18). Das Chromatogramm (Abb. 28) lässt mindestens 3 Komponenten vermuten, die nicht hinreichend getrennt werden konnten, so dass keine weiteren Analysen mit den gereinigten BChl-Vorstufen durchgeführt werden konnten.

Die massenspektroskopischen Analysen lieferten keine eindeutigen Ergebnisse, die die Identifizierung der isolierten Pigmente von ST3 bestätigen und die der Pigmente von GN11 ermöglichen könnten. Die in mehreren Spektren in großen Mengen vorhandenen Massen zwischen 640 m/z und 670 m/z können keiner BChl-Vorstufe zugeordnet werden. Für das in der GN11 Probe vermutete Divinyl-Protochlorophyllid wäre eine Masse von 610,2 m/z bzw. im Falle des Verlustes von Mq²⁺ von 588,2 m/z zu erwarten gewesen, doch findet sich keine der beiden im Massenspektrogramm. Unter den in geringeren Mengen vorhandenen Massen im Spektrogramm kann keine einer BChl-Vorstufe zugeordnet werden, die dem Divinyl-Protochlorophyllid im Syntheseweg folgt oder vorausgeht. Im Falle von ST3 wäre für das Chlorophyllid a bzw. das Magnesium freie Derivat Phaeophorbid a in einem FAB positiv-Ion Massenspektrum mit der verwendeten Matrix 3-Nitrobenzyl-Alkohol M*⁺-Ionen mit einem m/z Wert von 614,3 bzw. 592,1 zu erwarten gewesen (Breemen et al., 1991). Doch keines der beiden Pigmente kann eindeutig nachgewiesen werden. Bei einem erwarteten m/z Wert von 632,2 bzw. 610,2 für die 2-Desvinyl-2-α-Hydroxyethyl Chlorophyllid a bzw. das Magnesium freie Derivat für das zweite von ST3 isolierte Pigment liefert die MS-Analyse ebenfalls kein eindeutiges Ergebnis.

Die vorliegenden Untersuchungen konnten zeigen, dass sich in den beiden *R. rubrum* Stämmen BChl-Vorstufen in den ICMs anhäufen. Bei diesen Vorstufen handelt es sich um dieselben, die sich auch im Kulturmedium wieder finden. Die in den ICMs angehäuften BChl-Vorstufen sind mit mehreren Proteinen zu einem Pigment-Proteinkomplex assoziiert, wie die Isolation der Komplexe mit DHPC aus Chromatophoren der beiden Stämme gezeigt hat. Die gewonnenen Pigment-Proteinkomplexe zeigen Absorptionsspektren, die in Übereinstimmung sind mit Spektren ganzer Zellen und in beiden Fällen ein deutliches CD-Signal aufweisen.

Die Komplexe enthalten neun Proteine unterschiedlicher Größe, für die keine eindeutige Zuordnung getroffen werden konnte. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der isolierten Pigment-Proteinkomplexe vom ST3-Stamm zeigen partikuläre, ringförmige Strukturen. Sie neigen zur Aggregation und bilden unter diesen Umständen fädige und runde Formen aus. Die im ST3-Stamm angehäuften Vorstufen P660 und P667 konnten als 2-Devinyl-2- α -hydroxyethyl-phaeophorbid a und Phaeophorbid a bestimmt werden. Bei den im GN11-Stamm angehäuften Vorstufen handelt es sich um ein Gemisch verschiedener Vorstufen, in dem mit Sicherheit Magnesium 2,4 –Divinylphaeoporphyrin a₅ Monomethylester als eine Komponente enthalten ist.

In weiteren Arbeiten sollten die in den Pigment-Proteinkomplexen gefundenen Proteine eindeutig identifiziert und charakterisiert werden. Mit massenspektroskopischen Analysen sollte es möglich sein, die Identifizierung der im ST3 Stamm gefundenen Pigmente zu bestätigen und die Pigmente des GN11 Stammes zu identifizieren. Eine Weiterentwicklung der angewandten HPLC-Protokolle könnte für die Aufreinigung und Gewinnung reiner BChl-Vorstufen, sowie zu deren schnellen und einfachen Identifizierung, auch in bisher nicht näher charakterisierten Stämmen eingesetzt werden. Die Entwicklung eines in vitro Aktivitätsassays für die Chlorophyllid-Reduktase würde ein besseres Verständnis eines der letzten ungeklärten Schritte der BChl-Biosynthese liefern. Die Chlorophyllid-Reduktase könnte als neues Modellsystem für Pigment-Bindeproteine dienen. Inzwischen wurde auch die Struktur der verwandten Nitrogenasen gelöst, somit sollte es auch möglich sein, dies für die Chloropyhllid-Reduktase zu erreichen. Untersuchungen zur Regulation des BChl-Biosyntheseweges könnten neue und bisher noch nicht bekannte Regulationsmechanismen zu Tage fördern, oder zumindest ein besseres Verständnis der Kinetik der BChl-Synthese liefern. Hierzu wären auch noch weitere Enzymkinetische Untersuchungen einiger der BChl-Biosyntheseenzyme nötig. Fraglich ist auch noch immer der Mechanismus, der zur Ausscheidung der BChl-Vorstufen führt. Bisher bekannte Poren sind zu klein, um die BChl-Moleküle auszuschleusen. Eine direkte Diffusion über Membranen ist aufgrund der Ladung des Mg²⁺-lons in den Molekülen schwer vorstellbar. Dies könnte mit in Membranvesikel eingeschlossen BChl-Vorstufen untersucht werden, um zumindest eine direkte Diffusion zu bestätigen oder ausschließen zu können.

Auch wenn in den letzten fünfzig Jahren viele Einzelteile des großen Puzzles BChl-Biosynthese ihren richtigen Platz gefunden haben und die vorliegende Arbeit zumindest Ideen und Hinweise für weitere Teile liefern konnte, so gibt ist es doch noch einiges zu tun, um das Puzzle fertig zu stellen.

7. Referenzen

- Addlesee, H. A. and Hunter, C. N., 2002: *Rhodospirillum rubrum* possesses a variant of the *bchP* gene, encoding Geranylgeranyl-Bacteriopheophytin Reductase. *J. Bacteriol.*, 184: 1578.
- Ames, G. F., 1968: Lipids of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: structure and metabolism. *J. Bacteriol.*, 95: 833-843.
- Armstrong, G. A., 1998: Greening in the dark: Light-independent chlorophyll biosynthesis from anoxygenic photosynthetic bacteria to gymnosperms. *J. Photochem. Photobiol. B*, 43: 87-100.
- Bauer, C. E. and Bird, T. H., 1996: Regulatory circuits controlling photosynthesis gene expression. *Cell*, 85: 5-8.
- Beale, S. I., 1999: Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynth. Res.*, 60: 43-73.
- Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E. A., Reiss, B., and Schaller, H., 1982: Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn*5*. *Gene*, 19: 327-336.
- Belanger, F. C. and Rebeiz, C. A., 1980: Chloroplast Biogenesis: Detection of divinyl protochlorophyllide in higher plants. *J. Biol. Chem.*, 255: 1266-1272.
- Belanger, F. C., Duggan, J. X., and Rebeiz, C. A., 1982: Chloroplast Biogenesis: Identification of chlorophyllide a (E458F674) as a divinyl chlorophyllide a*. *J. Biol. Chem.*, 257: 4849-4858.
- Bollivar, D. W. and Bauer, C. E., 1992: Association of tetrapyrrole intermediates in the bacteriochlorophyll a biosynthetic pathway with the major outermembrane porin protein of *Rhodobacter capsulatus*. *Biochem. J.*, 282: 471.
- Bollivar, D. W., Suzuki, J. Y., Beatty, J. T., Dobrowolski, J. M., and Bauer, C. E., 1994: Directed mutational analysis of bacteriochlorophyll a biosynthesis in *Rhodobacter capsulatus. J. Mol. Biol.*, 237: 622-640.
- Breemen, R. B., Canjura, F. L., and Schwartz, S. J., 1991: Identification of chlorophyll derivatives by Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 39: 1452-1456.
- Burke, D. H., Alberti, M., and Hearst, J. E., 1993a: *bchFNBH* bacteriochlorophyll synthesis genes of *Rhodobacter capsulatus* and identification of the thrid subunit of light-independent protochlorophyllide reductase in bacteria and plants. *J. Bacteriol.*, 175: 2414-2422.

- Burke, D. H., Alberti, M., and Hearst, J. E., 1993b: The *Rhodobacter capsulatus* chlorin reductase-encoding locus, *bchA*, consists of three genes, *bchX*, *bchY*, and *bchZ*. *J. Bacteriol.*, 175: 2407-2413.
- Burke, D. H., E., H. J., and Sidow, A., 1993c: Early evolution of photsynthesis: Clues from nitrogenase and chlorophyll iron proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7134-7138.
- Cohen-Bazire, G. and Kunisawa, R., 1960: Some observations on the synthesis and function of the photosynthetic apparatus in *Rhodospirillum rubrum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 46: 1543-1553.
- Cohen-Bazire, G. and Kunisawa, R., 1963: The fine structure of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Cell Biol.*, 16: 401-419.
- Coomber, S. A., Chaudhri, M., Connor, A., Britton, G., and Hunter, C. N., 1990: Localized transposon Tn5 mutagenesis of the photosynthetic gene cluster of *Rhodobacter sphaeroides. Mol. Microbiol.*, 4: 977.
- Drews, G., Lampe, H. H., and Ladwig, R., 1969: Die Entwicklung des Photosyntheseapparates in Dukelkulturen von *Rhodopseudomonas capsulata. Arch. Microbiol.*, 65: 12-28.
- Drews, G., Leutiger, I., and Ladwig, R., 1971: Production of protochlorophyll, protopheophytin, and bacteriochlorophyll by the mutant A1a of *Rhodopseudomonas capsulata. Arch. Microbiol.*, 76: 349.
- Drews, G., 1974: Composition of a protochlorophyll-protopheophytin-complex, excreted by mutant strains of *Rhodopseudomonas capsulata*, in comparison with the photosynthetic apparatus. *Arch. Microbiol.*, 100: 397.
- Forreiter, C. and Apel, K., 1993: Light-independent and light-dependent protochlorophyllide-reducing activities and two distinct NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase polypeptides in mountain pine (*Pinus mugo*). *Planta*, 190: 536-545.
- Fujita, Y. and Bauer, C. E., 2000: Reconstitution of light-independent protochlorophyllide reductase from purified *bchL* and *bchN-bchB* subunits. *J. Biol. Chem.*, 275: 23589-23588.
- Ghosh, R., Hardmeyer, A., Thoenen, I., and Bachofen, R., 1994: Optimization of the Sistrom culture medium for large-scale batch cultivation of *Rhodospirillum rubrum* under semiaerobic conditions with maximal yield of photosynthetic membranes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 1698-1700.
- Goodhew, C., Brown, K., and Pettigrew, G., 1986: Haem staining in gels, a useful tool in the study of bacterial c-type cytochromes. *Biochim. Biophys. Acta: Protein Structure and Molecular Enzymology*, 852: 288-294.

- Holt, S. C. and Marr, A. G., 1965: Effect of light intensity on the formation of intracytoplasmic membranes in *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.*, 89: 1421-1429.
- Hunter, C. N., McGlynn, P., Ashby, M. K., Burgess, J. G., and Olsen, J. D., 1991: DNA sequencing and complementation/deletion analysis of the *bchA-puf* operon region of *Rhodobacter sphaeroides*: In vivo mapping of the oxygenregulated *puf* promoter. *Mol. Microbiol.*, 5: 2649.
- Hutner, S. H., 1972: Inorganic nutrition. Ann. Rev. Microbiol., 26: 313.
- Jones, O. T., 1964: Studies on the structure of a pigment related to chlorophyll a produced by *Rhodopseudomonas spheroides*. *Biochem. J.*, 91: 572-576.
- Jones, O. T. G., 1963a: The production of magnesium protoporphyrin monomethyl ester by *Rhodopseudomonas spheroides*. *Biochem. J.,* 86: 429-432.
- Jones, O. T. G., 1963b: Magnesium 2,4 -divinylphaeoporphyrin a₅ monomethyl ester, a protochlorophyll-like pigment produced by *Rhodopseudomonas spheroides*. *Biochem. J.*, 89: 182-189
- Jones, O. T. G., 1963c: The inhibition of bacteriochlorophyll biosynthesis in *Rhodopseudomonas spheroides* by 8-hydroxyquinoline. *Biochem. J.*, 88: 335-343.
- Kaplan, S., 2002: Photosynthesis genes and their expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: A tribute to my students and associates. *Photosynth. Res.*, 73: 95-108.
- KEGG, 1995-2006: KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: Release 39.0: Kanehisa Laboratories.
- Kessi, J., Poiree, J.-C., Wehrli, E., Bachofen, R., Semenza, G., and Hauser, H., 1994: Short-chain phosphatidylcholines as superior detergents in solubilizing membrane proteins and preserving biological activity. *Biochemistry*, 33: 10837 - 10841.
- Kessi, J., Ghosh, R., and Bachofen, R., 1995: Purification of an LHI-RC-complex of *Rhodospirillum rubrum* by solubilization of chromatophores with a short-chain lecithin. *Photosynth. Res.*, 46: 353.
- Laemmli, U. K., 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680.
- Lascelles, J., 1966: The accumulation of bacteriochlorophyll precursors by mutant and wild-type strains of *Rhodopseudomonas spheroides*. *Biochem. J.*, 100: 175-183.
- Lascelles, J. and Altshuler, T., 1967: Some properties of mutant strains of *Rhodopseudomonas spheroides* which do not form bacteriochlorophyll. *Arch. Microbiol.*, 59: 204.
- Leeper, F. J., 1989: The biosynthesis of porphyrins, chlorophylls, and vitamin B12. *Nat. Prod. Rep.,* 6: 171-203.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., 1951: Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Marrs, B. and Gest, H., 1973: Regulation of bacteriochlorophyll synthesis by oxygen in respiratory mutants of Rhodopseudomonas capsulata. *J. Bacteriol.*, 114: 1052-1057.
- Mazodier, P., Cossart, P., Giraud, E., and Gasser, F., 1985: Completion of the nucleotide sequence of the region of Tn5 confirms the presence of three resistance genes. *Nucl. Acids Res.*, 13: 195-205.
- Oelze, J., Biedermann, M., Freund-Mölbert, E., and Drews, G., 1969: The bacteriochlorophyll content and protein composition of thylakoids of *Rhodospirillum rubrum* during morphogenesis of the photosynthetic apparatus [Bacteriochlorophyllgehalt und Proteinmuster der Thylakoide von *Rhodospirillum rubrum* während der Morphogenese des Photosynthese-Apparates.]. *Arch. Microbiol.*, 66: 154.
- Oelze, J. and Drews, G., 1970: Die Ausscheidung von partikelgebundenen Bacteriochlorophyllvorstufen durch die Mutante F9 von *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Microbiol.*, 73: 19.
- Oelze, J. and Drews, G., 1972: Membranes of photosynthetic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta,* 265: 209.
- Oelze, J., 1976: Early formation of intracytoplasmic membranes in *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim. Biophy. Acta*, 436: 95.
- Peschek, G. A., Hinterstoisser, B., Pineau, B., and Missbichler, A., 1989: Lightindependent NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase activity in purified plasma membrane from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 162: 71-78.
- Peterson, G. L., 1977: A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, 83: 346.
- Pradel, J. and Clement-Metral, J. D., 1976: A 4 vinylprotochlorophyllide complex accumulated by 'phofil' mutant of *Rhodopseudomonas spheroides*. An authentic intermediate in the development of the photosynthetic apparatus. *Biochim. Biophys. Acta*, 430: 253.
- Pudek, M. R. and Richards, W. R., 1975: A possible alternate pathway of bacteriochlorophyll biosynthesis in a mutant of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Biochemistry*, 14: 3132-3137.

- Raymond, J., Zhaxybayeva, O., Gogarten, J. P., Gerdes, S. Y., and Blankenship, R. E., 2002: Whole-Genome analysis of photosynthetic prokaryotes. *Science*, 298: 1616-1620.
- Richards, W. R. and Lascelles, J., 1969: The biosynthesis of bacteriochlorophyll. The characterization of latter stage intermediates from mutants of *Rhodopseudomonas spheroides*. *Biochemistry*, 8: 3473.
- Richards, W. R., Wallace, R. B., Tsao, M. S., and Ho, E., 1975: The nature of a pigment protein complex excreted from mutants of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Biochemistry*, 14: 5554.
- Saari, L. L., Triplett, E. W., and Ludden, P. W., 1984: Purification and properties of the activating enzyme for iron protein of nitrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.*, 259: 15502.
- Sägesser, R., 1992: Identifikation und charakterisierung des Photosynthese-Genclusters von *Rhodospirillium rubrum*. Dissertation, Institut für Pflanzenbiologie, Universität Zürich, Zürich. Pages pp.
- Schick, J. and Drews, G., 1969: The morphogenesis of the bacterial photosynthetic apparatus. 3. The features of a pheophytin-protein-carbohydrate complex excreted by the mutant M 46 of *Rodospirillum rubrum*. *Biochim. Biophy. Acta*, 183: 215.
- Shioi, Y., 1991: Analytical chromatography of chlorophylls. *In* Scheer, H. (ed.), *Chlorophylls*. Boca Raton, FL: CRC Press, 59-88.
- Sistrom, W. R., 1960: A requirement for sodium in the growth medium of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *J. Gen. Microbiol.*, 22: 77-85.
- Stahlberg, H., Dubochet, J., Vogel, H., and Ghosh, R., 1998: Are the lightharvesting I complexes from *Rhodospirillum rubrum* arranged around the reaction centre in a square geometry? *J. Mol. Biol.*, 282: 819.
- Suzuki, J. Y. and Bauer, C. E., 1995: Altered monovinyl and divinyl protochlorophyllide pools in *bchJ* mutants of *Rhodobacter capsulatus*. *J. Biol. Chem.*, 270: 3732-3740.
- Suzuki, J. Y., Bollivar, D. W., and Bauer, C. E., 1997: Genetic analysis of chlorophyll biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.*, 31: 61-89.
- Thomas, P. E., Ryan, D., and Levin, W., 1976: An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 75: 168-176.
- Wellington, C. L., Taggart, A. K. P., and Beatty, J. T., 1991: Functional significance of overlapping transcripts of *crtEF*, *bchCA* and *puf* photosynthesis gene operons in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.*, 173: 2954-2961.

- Wellington, C. L., Bauer, C. E., and Beatty, J. T., 1992: Photosynthesis gene superoperons in purple nonsulfur bacteria: tip of the iceberg? *Can. J. Microbiol.*, 38: 20-27.
- Wessel, D. and Flügge, U. I., 1984: A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry*, 138: 141-143.
- Willows, R. D., 2003: Biosynthesis of chlorophylls from protoporphyrin IX. *Nat. Prod. Rep.,* 20: 327-341.
- Yang, Z. and Bauer, C. E., 1990: *Rhodobacter capsulatus* genes involved in early steps of the bacteriochlorophyll biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.*, 172: 5001-5010.
- Zsebo, K. M. and Hearst, J. E., 1984: Genetic-physical mapping of a photosynthetic gene cluster from *Rhodobacter capsulatus*. *Cell*, 37: 937-347.

8. Anhang

Anhang 1.1: MS-Spektrum von GN11 Pigmenten, isoliert von einer DC



Anhang 1.2: MS-Spektrum der Pigmente der ST3-H Bande, isoliert von einer DC





Anhang 1.3: MS-Spektrum der Pigmente der ST3-L Bande, isoliert von einer DC







Anhang 1.5: MS-Spektrum der ST3-5/667 Pigmente

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei **Prof. Dr. Robin Ghosh** für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, die Arbeit in der Abteilung Bioenergetik durchzuführen, herzlich bedanken. Seine hilfreichen Ratschläge und Ideen und nicht zuletzt seine Diskussionsbereitschaft erleichterten meine Arbeit sehr.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen Kollegen der Abteilung Bioenergetik bedanken, die mich bei allen auftretenden Problemen mit Rat und Tat unterstützt haben: **Maria Tsichouridou, Gerasimoula Gerasimidou, Caroline Autenrieth**.

Prof. Dr. Andreas Kuhn (Universität Hohenheim) gilt mein Dank für die Möglichkeit der Nutzung des Nah-IR-CD-Spektrophotometers und speziell **Dr. Uwe Gerken** (Universität Hohenheim) für seine Unterstützung bei den CD-Messungen.

Prof. Dr. Arnd G. Heyer und **Dr. Heidrun Distelbarth** danke ich für die hilfreichen Ratschläge und die Aushilfe mit Werkzeugen, Chemikalien und Ersatzteilen, die es mir ermöglicht haben, die HPLC Anlage der Abteilung zu reaktivieren.

Simon Stutz, Maria Tsichouridou und Katharina Kittelmann danke ich für ihre Unterstützung während der Hoch- und Tiefphasen bei der Erstellung der Arbeit, ihre Diskussionsbereitschaft und die schönen Abende außerhalb des Labors, die dazu beitrugen, den Kopf frei zu bekommen und neue Kraft zu schöpfen. Besonderen Dank gebührt Katharina Kittelmann für das kritische Lesen des Manuskripts und die konstruktiven Anmerkungen.