PIGMENTMODIFIKATIONEN IN PERIPHEREN LICHTSAMMELKOMPLEXEN AUS PURPURBAKTERIEN: AUSTAUSCH IN DER B800-BINDUNGSTASCHE

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilinas-Universität

München

vorgelegt von

Beate Ücker

Meiling, 2003

1. Berichterstatter: Prof. Dr.. H. Scheer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Ebel

Tag der mündlichen Prüfung: 13.02.2004

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Phytochemie des Botanischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hugo Scheer durchgeführt. Ihm möchte ich ganz herzlich für die Bereitstellung des Themas, die ständige Förderung und Diskussion, sowie seinen Glauben an das Beenden dieser Arbeit danken.

Für die herzliche Aufnahme in Ihren Laboratorien und Ihre Gastfreundschaft möchte ich mich bei Prof. Dr. Richard Cogdell (University of Glasgow, Division of Biochemistry and Molecular Biology) und Dr. Dieter Leupold (Max-Born-Insitut, Berlin) und ihren Mitarbeitern bedanken.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei all meinen Laborkollegen für Ihre moralische, seelische und fachliche Unterstützung. Mein besonderer Dank gilt dabei Dr. Michael Bandilla, der mich in die Tiefen der LH2s führte und verwirrt zurückließ, Claudia Bubenzer-Hange, die mich vor dem Tragen von Leggins bewahrte, Dr. Markus Fischer, für seine Lektionen in Sachen Spinnen, Dr. Bernhard Gall für seine vernünftigen Art und dass er manchmal auch ein bisschen unvernünftig sein konnte, Ines Haame, die dabei war, nicht immer aber immer öfter, Dr. Nina Kammhuber, bestes Es von Welt, für Ihre Bemühungen das Phlegma zu kurieren, Dr. Arne Näveke, der mir auf Kongressen Asyl gewährte, Theresa Neuner für den Exkurs in die Tupper-Welt, Dr. Siegfried Siebzehnrübl für seine ethanolischen Essenzen, Ingrid Simonin, die mir zeigte, dass ein Hauptgewinn mit Arbeit verbunden sein kann, Dr. Heike Snigula, weil Heikel Anders ist und nie müde wurde uns in das Geheimnis der optischen Dichten einzuführen, Dr. Max Storf, der mich beim französisch lernen vor Brotspinnen bewahrte, Dr. Andrea Zehetner, die für Event-Fragen zuständig ist, wann geht man mit wem warum wohin, Brigitte Wilhelm, von der ich lernte, dass man aus allem eine Trommel bauen kann. Und bei zwei Pärchen bei denen ich zumindest den Umgang mit schwierigen Menschen erlernte.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Margrit Amelunxen für das doch sehr mühselige Korrekturlesen.

Für die finanzielle Unterstützung der Promotion danke ich der Hans-Fischer-Gesellschaft, München und der DFG.

Last but not least bei meiner Mutter und Dr. Christian Sommer für Ihre unendliche Geduld.

Geheimnisvoll am lichten Tag,

Lässt sich Natur des Schleiers nicht berauben,

Und was sie deinem Geist nicht offenbaren mag,

Das zwingst du ihr nicht ab mit Hebeln und mit Schrauben.

(J.W.Goethe)

Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits zum Teil veröffentlicht in:

Bandilla M.; Ücker B.; Ram M.; Simonin I.; Gelhaye E.; McDermott G.; Cogdell R.; Scheer, H. (1998) Reconstitution of the B800 bacteriochlorophylls in the peripheral light harvesting complex B800-850 of *Rhodobacter sphaeroides 2.4.1.* with BChl a and modified (Bacterio-) chlorophyll. Biochim. Biophys. Acta.; 1364: 390-402.

Fraser N.; Herek J.; Pullerits T.; Polvika T.; Sundström V.; Ücker B.; Katheder I.; Scheer H.; Dominy P.; Cogdell R. A. (1998) Study of the energetic properties of LH2 complexes from *Rps. acidophila* 10050 containing modified (bacterio)chlorin molecules. In: Garab G. Photosynthesis: Mechanisms and Effects. pp. 77-80. Kluwer, Dordrecht.

Fraser N. J.; Dominy P. J.; Ücker B.; Simonin I.; Scheer H.; Cogdell R. (1999) Selective release, removal and reconstitution of BChl *a* molecules into the B800 sites of LH2 complexes from *Rhodopseudomonas acidophila* 10050. Biochemistry; 38: 9684-9692.

Gelhaye E.; McDermott G.; Bandilla M.; Ücker B.; Scheer H.; Cogdell R. J. (1995) B800 substitution of the B800-850 light harvesting complex of *Rhodopseudomonas acidophila.* In: Mathis P. Photosynthesis: From Light to Biosphere. pp. 69-72. Kluwer, Dordrecht.

Ihalainen J. A.; Linnanto J.; van Stokkum I. H. M.; Myllyperkio P.; Kallioinen J.; Ücker B.; Scheer H.; Korppi-Tommola J. E. I. (2001) Energy transfer in LH2 of *Rhodospirillum molischianum* studied by subpicosecond spectroscopy and configuration interaction exciton calculations. J. Phys. Chem. B. 105: 9849-9856.

Leupold D.; Stiel H.; Ehlert J.; Nowak F.; Teuchner K.; Bandilla M.; Ücker B.; Scheer H. (1999) Photophysical characterization of the B800-depleted light harvesting complex B800 ->850nm. Chem. Phys. Lett. 301: 537-545.

Leupold D.; Stiel H.; Teuchner K.; Nowak F.; Sandner W.; Ücker B.; Scheer H. (1996) Size enhancement of transition dipoles to one- and two-exciton bands in a photosynthetic antenna. Phys. Rev. Let. 77 (22): 4675-4678.

Ücker B.; Fraser N.; Cogdell R.; Scheer H. (1998) Spectral and photochemical properties of light-harvesting-complex II of purple bacteria treated with sodium borohydride. In: Garab G. Photosynthesis: Mechanisms and Effects. pp. 61-64. Kluwer, Dordrecht.

1 Einleitung 1

1.1 Taxonomie der Rhodospirillales 1

1.2 Photosystem der Purpurbakterien und Mechanismus des Energietransfers 4

1.3 Struktur von Lichtsammlerkomplexen aus Purpurbakterien 6

1.4 Zusammensetzung und Funktion der Proteine in den Antennen 9

1.5 Zusammensetzung und Eigenschaften der Kofaktoren in LH2 10

1.5.1 Die Rolle der Bakteriochlorophylle in den Antennen 10

1.5.2 Die Rolle der Carotinoide in den Antennen 12

1.5.3 Unterschiede zwischen freien und antennengebundenen Pigmenten 13

1.6 Pigmentaustausch 15

1.7 Aufgabenstellung 17

2 Material und Methoden 18

2.1 Präparationen 18

2.1.1 Anzucht der Bakterien 18

2.1.1.1 Anzuchtsbedingungen für *Rhodobacter sphaeroides* 19

2.1.1.2 Anzuchtsbedingungen für *Rhodopseudomonas acidophila* 20

2.1.1.3 Anzuchtsbedingungen für *Rhodospirillum molischianum* *Rhodopseudomonas palustris* und *Rubrivivax gelatinosus* 21

2.1.1.4 Anzuchtsbedingungen für *Chromatium purpuratum* 22

2.1.2 Isolierung der LH2 aus Purpurbakterien 23

2.1.2.1 Isolierung der Chromatophore 23

2.1.2.2 Isolierung der Lichtsammelkomplexe II 24

2.1.3 Rekonstitution von LH2 mit modifizierten Pigmenten 24

2.1.3.1 Optimierung der BChl-B800 Extraktion 24

2.1.3.2 Optimierte Methode zur Entfernung der BChl-B800 25

2.1.3.3 Optimierung der Rekonstitution des BChl-B800 mit BChl 25

2.1.3.4 Optimierte Methode zur Rekonstitution mit modifizierten Pigmenten 26

2.1.4 Pigmentextraktionen und -synthesen 27

2.1.5 Reaktion der LH2 mit Natriumborhydrid 28

2.2 Analytische Methoden 28

2.2.1 SDS-PAGE 28

2.2.2 Pigmentanalyse über HPLC 30

2.3 Spektroskopische Methoden 32

2.3.1 Absorption 32

2.3.2 Circulardichroismus 32

2.3.3 Fluoreszenz 32

3 Charakterisierung von LH2 33

3.1 Einführung 33

3.2 Isolierung der peripheren Antennen 33

3.3 Spektrale und chromatographische Eigenschaften der LH2 34

3.3.1 Absorption 34

3.3.2 Circulardichroismus 36

3.3.3 Fluoreszenz 38

3.3.4 Proteinzusammensetzung 41

3.3.5 Pigmentzusammensetzung 42

3.4 Diskussion 44

4 Extraktion des Bchl-B800 aus LH2 47

4.1 Optimierung der bestehenden Methode 47

4.1.1 Detergensabhängigkeit der B800-Extraktion 48

4.1.2 Abhängigkeit der B800-Extraktion von der Antennenkonzentration 50

4.1.3 pH-Abhängigkeit der B800-Extraktion 51

4.1.4 Temperaturabhängigkeit der B800-Extraktion 53

4.2 Charakteristika des p(850)-Komplexes aus *Rb. sphaeroides* 56

4.3 Extraktionsversuche bei LH2-Komplexen aus anderen Organismen 63

4.4 Diskussion 68

5 Rekonstitution mit modifizierten Pigmenten in LH2 71

5.1 Optimierung der Rekonstitution mit BChl bei *Rb. sphaeroides* 72

5.1.1 Abhängigkeit der BChl-B800 Rekonstitution vom Detergens 73

5.1.2 Einfluss der Antennenkonzentration auf die Rekonstitution 74

5.1.3 Einfluss der Pigmentkonzentration auf die Rekonstitution 75

5.1.4 Einfluss von Temperatur auf die Rekonstitution 76

5.2 Vergleich zwischen nativem LH2 und mit BChl rekonstituierten LH2 aus *Rb. sphaeroides* 77

5.2.1 Absorptionsspektroskopie 77

5.2.2 Circulardichroismus 78

5.2.3 Fluoreszenz 80

5.2.4 HPLC 82

5.2.5 SDS-PAGE 84

5.3 Rekonstitution von BChl in LH2-Komplexe aus *Rps. acidophila* 84

5.3.1 Optimierung der Rekonstitution von BChl in LH2 aus *Rps. acidophila* .84

5.3.2 Vergleich zwischen nativen und den mit BChl rekonstituierten LH2 aus *Rps. acidophila* 86

5.4 Rekonstitution mit modifizierten Pigmenten 92

5.4.1 Pigmentauswahl 92

5.4.2 Nachweis einer Rekonstitution 94

5.4.3 Rekonstitution mit [3^1-OH]-BChl 94

5.4.4 Rekonstitution mit anderen modifizierten Pigmenten 101

5.5 Diskussion 106

6 Selektive Reduktion von BChl-B800 des LH2 mit Natriumborhydrid 110

6.1 Einführung 110

6.2 Reaktion von BChl mit $NaBH_4$ 111

6.3 Selektive Reduktion von BChl-B800 in LH2 aus *Rs. molischianum* 112

6.4 Selektive Reduktion von BChl-B800 in LH2 aus anderen Bakterien ...119

6.5 Diskussion 126

7 Zusammenfassung 128

8 Literatur 130

Abkürzungen

λ_{max}	Absorptionsmaximum im NIR
a.u.	arbitrary units
BChl	Bakteriochlorophyll a
BChl-B800 bzw. B800; BChl-B850 bzw. B850	BChl, das in der B800 bzw. B850-Bindungstasche des LH2 gebunden ist
B800-850	peripherer Lichtsammelkomplex
B875	BChl, das in der B875 des LH1 gebunden ist
BPhe	Bakteriopheophytin(e)
CD	Circulardichroismus
CHAPS	3-[3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
Chl	Chlorophyll(e)
CMC	Kritische Mizellen Konzentration
DAD	Diode array detected
DE	Diethylether
DEAE	Diethyl-Aminoethyl-Zellulose
DM	n-Dodecyl-β-D-Maltosid
EET	Excitation energy transfer
EIRS	enviroment induced red shifts
ET	Energietransfer
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICM	intrazytoplasmatische Membran
LDAO	N-Dodecyl-N,N-dimethylamin-N-oxid
LDS	Lithium-Dodecylsulfat
LH	Lichtsammelkomplex
NIR	naher Infrarotbereich
OD	Optische Dichte
OG	Octyl-β-D-glycosid
p(850) / p(820)	peripherer Lichtsammelkomplex, bei dem selektiv das BChl-B800 entfernt wurde
PAGE	Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese
Phe	Pheophytin(e)
PM	Photomultiplier
Rb.	*Rhodobacter*
Rbv.	*Rubrivivax*
RC	Reaktionszentrum
Rc.	*Rhodocyclus*
Rps.	*Rhodopseudomonas*
Rs.	*Rhodospirillum*
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TD-Puffer	Tris/Acetat-Puffer + DM
TL-Puffer	Tris/HCl-Puffer + LDAO
Tris	Tris-hydroxylmethyl-aminomethan

1 EINLEITUNG

Die Primärprozesse der Photosynthese sind die Lichtabsorption, der Energietransfer und die Umwandlung der absorbierten Energie in ein elektrochemisches Membranpotential. Diese laufen in unterschiedlichen Pigment-Protein-Komplexen ab: den Antennen- oder Lichtsammlern und den photochemisch aktiven Reaktionszentren. Als Chromophore enthalten sie (Bakterio-)Chlorophylle, Carotinoide und Phycobiline. Die Bindung an die Proteine modifiziert die biophysikalisch relevanten Eigenschaften der Pigmente wie Absorptionsverhalten oder Redoxpotential und erlaubt den Aufbau definierter Strukturen. Beide Voraussetzungen müssen erfüllt sein, um einerseits einen Energie-transfer zum Reaktionszentrum mit hoher Quantenausbeute und möglichst geringen biosynthetischen Investitionen pro absorbiertem Quant zu gewährleisten (Antennen-system), und um andererseits möglichst effizient die Energie zum Aufbau eines elektro-chemischen Membranpotentials zu nutzen (Reaktionszentren). Dies wurde bisher am besten bei *Rhodopseudomonas sphaeroides* untersucht.

1.1 Taxonomie der Rhodospirillales

Die Klassifizierung von Arten basiert auf der 16S rRNA-Analyse [Woese et al. 1985; Stackenbrand et al. 1988] unter Berücksichtigung der Morphologie und des Stoff-wechsels. Phototrophe Purpurbakterien zählen zur Klasse der Rhodospirillales. Zu ihr gehören alle Bakterien, die in ihren Reaktionszentren (RC) Bakteriochlorophyll a (BChl) oder b enthalten, und die anoxygene Photosynthese betreiben. Tabelle 1-1 skizziert die aktuelle Taxonomie der Rhodospirillales, die sich in zwei Ordnungen unterteilt, in die Rhodospirillineae und die Chlorobiineae.

Die Ordnung der Chlorobiineae enthält die phototrophen Bakterien, die BChl c-, d- oder e-haltige Antennen besitzen. Diese Pigmente sind in linsen- oder zigarrenförmigen Organellen, den sogenannten Chlorosomen lokalisiert. Die Cytoplasmamembran erscheint einheitlich aufgebaut und man findet keine Einstülpungen. Zu dieser Ordnung zählen die Familien der Chlorobiaceae und die Chloroflexaceae.

Zur Ordnung der Rhodospirillineae gehören nur solche Bakterien, die in ihrem RC BChl a oder b besitzen. Diese Pigmente sind immer in der intracytoplasmatischen Membran (ICM) lokalisiert, die in der Regel als Membranausstülpungen aus der Cytoplasma-membran (CM) hervorgehen, ohne sich jedoch von dieser abzuschnüren [Donohue & Kaplan 1986]. Die ICM können nach Aufbrechen der Zellen von anderen Membran-fraktionen aufgrund der höheren spezifischen Dichte abgetrennt und als Chromatophore in Form von inside-out-Vesikeln

isoliert werden. Die Rhodospirillineae werden in die Familien der Rhodospirillaceae, Chromatiaceae und Ectothiorhodospiraceae unterteilt.

Die Chromatiaceae, auch purpurne Schwefelbakterien genannt, wachsen unter photo-autotrophen Bedingungen mit Sulfid und einigen Verbindungen wie elementarem Schwefel, Sulfit oder Thiosulfat als Elektronendonoren. Während der Oxidation von Sulfid zu Sulfat wird elementarer Schwefel innerhalb der Zelle abgelagert. Photo-heterotrophes, chemoautotrophes und/oder chemoheterotrophes Wachstum konnte für einige Arten gezeigt werden. Die Chromatiaceae kommen oft in Seen vor. Als Pigmente findet man verschiedene Arten von Carotinoiden und normalerweise Bakterio-chlorophyll a (BChl). Diese sind in der ICM lokalisiert, die Vesikeln bilden, die einzige Ausnahme ist das BChl b-haltige *Thiocapsa pfennigii*, welches einen tubulären ICM besitzt.

Die Ectothiorhodospiraceae unterscheiden sich von den Chromatiaceae durch die zwischenzeitliche Lagerung von elementarem Schwefel außerhalb der Zelle. Zudem gibt es charakteristische Abhängigkeiten von salinischen oder alkalischen Wachstums-bedingungen. Die ICM besteht aus flachen thylakoidartigen Membranen, die als lamellare Stäbchen vorliegen.

Rhodospirillaceae oder Nichtschwefelpurpurbakterien sind die vielfältigste und die am besten untersuchte Gruppe phototropher Bakterien. Diese Bakterien gedeihen bevorzugt unter photoheterotrophen Bedingungen, viele sind aerotolerant und können sich auch unter chemoheterotrophen Bedingungen im Dunkeln entwickeln. Sie wachsen bevorzugt in Frischwasser, wo sie unter anoxygenen, schwefelarmen Bedingungen leben. Die ICM ist in der Familie der Rhodospirillaceae sehr unterschiedlich. So kommen in Arten wie *Rhodopseudomonas (Rps.) viridis* und *Rps. palustris* große unregelmäßig angeordnete „Thylakoide“ vor, die teilweise in Lamellen gestapelt sind [Imhoff 1983], während in *Rhodospirillum (Rs.) molischianum* die thylakoidartigen Membranen gleichmäßig gestapelt sind. Vesikulare Einstülpungen der Cytoplasma-membran werden in Arten wie *Rs. rubrum, Rhodobacter (Rb.) capsulatus* und *Rb. sphaeroides* [Remsen et al. 1982] gefunden, und fingerförmige Einstülpungen in Arten wie *Rhodocyclus (Rc.) purpureus, Rc. tenuis* und *Rubrivivax (Rbv.) gelatinosus* [Imhoff et al. 1984].

Klasse	**Rhodospirillales**				
Ordnung	Rhodospirillineae Purpurbakterien			Chlorobiineae grüne Bakterien	
Familie	Rhodospirillaceae Nichtschwefel-purpurbakterien	Chromatiaceae Schwefelpurpur-bakterien	Ectothiorhodo-spiraceae	Chlorobiaceae Grüne Schwefelbakterien	Chloroflexaceae Grüne Flexibakterien

Rhodospirillaceae (Nichtschwefelpurpurbakterien)

Gattung	*Rhodospirillum*	*Rhodopila*	*Rhodocyclus*	*Rhodomicrobium*	*Rhodobacter*	*Rhodopseudomonas*
Art	*molischianum* *rubrum* *tenue* *photometricum* *fulvum*	*globiformis*	*purpureus* *gelatinosus*	*vannielli*	*sphaeroides* *capsulatus* *sulfidophilus* *adriaticus*	*acidophila* *palustris* *viridis* *marina* *cryptolactis*

Tabelle 1-1: Klassifizierung phototropher Bakterien. Es werden nur Gattungen und Arten von Rhodospirillaceae gezeigt

1.2 Photosystem der Purpurbakterien und Mechanismus des Energietransfers

Der Photosyntheseapparat anoxygener Purpurbakterien (Rhodospirillaceae) ist relativ einfach aufgebaut: Normalerweise besitzen sie zwei (LH1 und LH2), in einigen Fällen sogar nur einen Typ (LH1) von Antennenkomplexen (Bild 1-1). Der Lichtsammler-komplex 1 (LH1 oder B875, die Zahlenangabe steht für das Absorptionsmaximum im nahen Infrarotbereich (NIR)) ist eng mit dem Reaktionszentrum (RC) verbunden und bildet mit ihm zusammen den sogenannten Kernkomplex. Peripher dazu ist in den meisten der Lichtsammlerkomplex 2 (LH2) angeordnet und zwar in einer Stöchiometrie, die von den Wachstumsbedingungen abhängt. Er wird analog zum B875 entsprechend seines Absorptionsmaxima im NIR als B800-850 bzw. B800-820 bezeichnet.

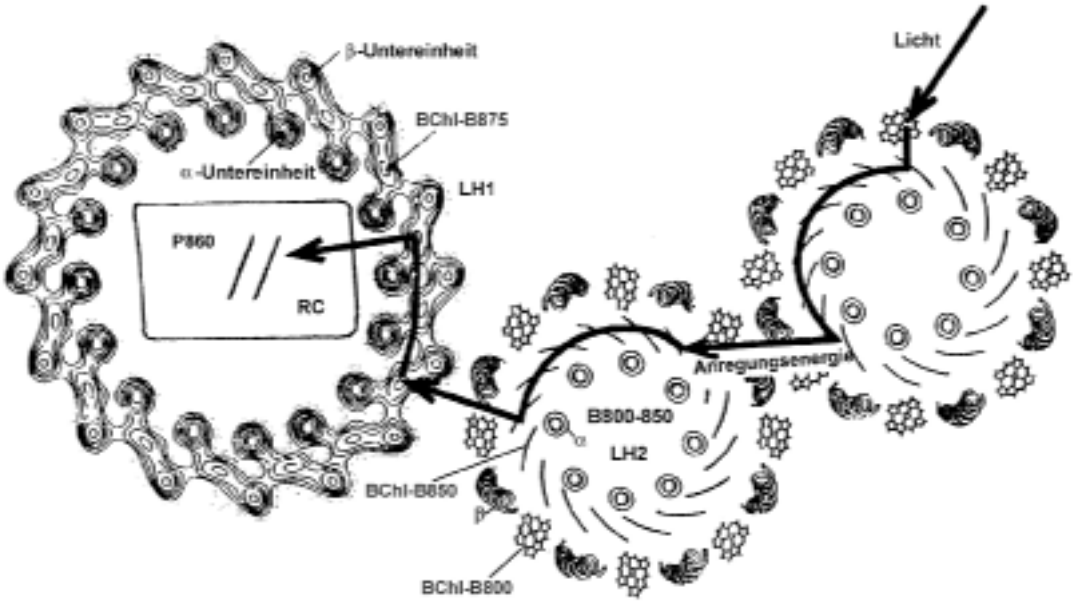


Bild 1-1: Mögliche Anordnung der Pigment-Protein-Komplexe in *Rs. molischianum* und voraussichtlicher Energietransfer in einer bakteriellen Photosynthese-Einheit [Kühlbrandt 1995]

In den Antennen absorbieren Pigmente wie Bakteriochlorophylle (BChl) und Carotinoide das Sonnenlicht und transportieren diese Energie innerhalb von 10 – 100 ps zum RC. Ein kaskadenartiger und damit gerichteter Energiefluss zum RC wird thermo-dynamisch dadurch gesteuert, dass verschiedene Antennenpigmente mit abnehmender Absorptionsenergie zum RC hin angeordnet sind und gleiche Pigmente ihre Absorptionseigenschaften durch unterschiedliche Assoziation mit dem sie umgebenden Protein und durch excitonische Wechselwirkung mit Nachbarpigmenten entsprechend variieren können (Bild 1-1).

Innerhalb der Antennenkomplexe erfolgt eine ultraschnelle Energiewanderung, wobei das mehrere hundert Chromophore enthaltende System nach 10 - 100 ps thermisch äquilibriert ist. Aufgrund der Morphologie, d.h. der räumlichen Anordnung der Pigmente innerhalb der Proteinmatrix, erhöhen dabei die niederenergetischen, höher populierten Lichtsammler-Komplexe (LH1) die Excitonendichte nahe am RC, dessen Absorptionsquerschnitt auf diese Weise, bei gleichbleibend hoher Quantenausbeute der Ladungstrennung, um 1-2 Größenordnungen erhöht wird.

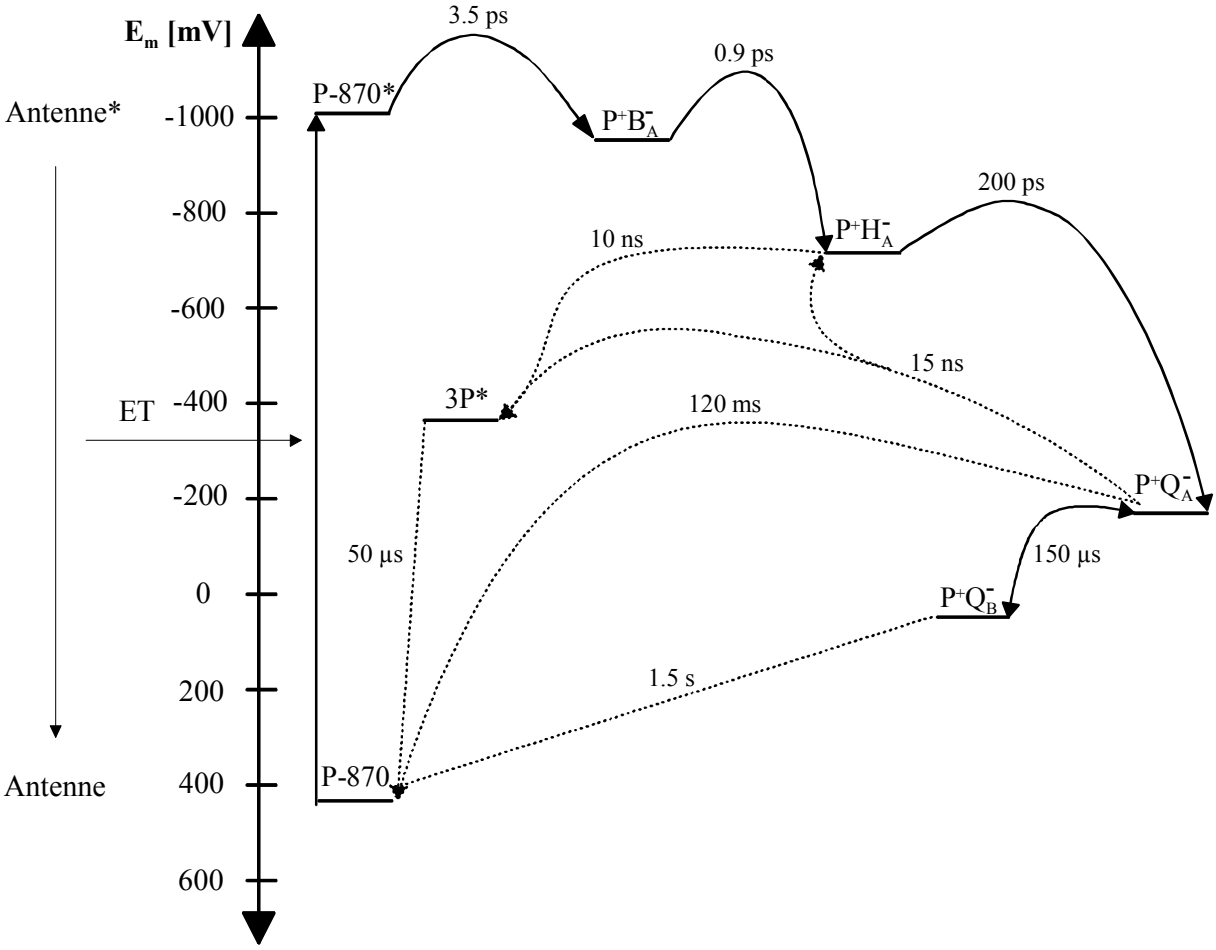


Bild 1-2: Schematische Darstellung der Elektronentransportkette im bakteriellen Reaktionszentrum mit der energetischen Lage der einzelnen Zwischenstufen, nur der Lichtsammler-Komplex ist ohne Bezug auf sein Potential eingetragen [Mäntele 1990; Hartwich 1994].

Im RC, einem transmembranen Pigment-Protein-Komplex, findet dann die eigentliche Energieumwandlung und Ladungstrennung statt (Bild 1-2) [Mäntele 1990; Hartwich 1994].

Die Anregungsenergie wird auf ein BChl-Dimer (P, primary donor / spezial pair) transferiert. Es startet eine Ladungstrennung, der mindestens zwei sehr schnelle Elektronentransfer-Schritte von der periplasmischen („äußeren“) zur cytoplasmischen („inneren“) Seite der Membran folgen. Nach etwa 200 ps entsteht somit ein membran-überspannender ladungsgetrennter Zustand, der für mehr als 100 µs stabil ist. Dieser stabilisierte ladungsgetrennte Zustand besteht aus einem oxidierten BChl-Donor $P^{+\bullet}$ und einem reduzierten Chinon-Akzeptor $Q_A^{-\bullet}$. Die Potentialdifferenz kann konsekutiv zur Synthese energiereicher Verbindungen ausgenutzt werden.

Der letztendliche Elektronenakzeptor im RC der Purpurbakterien, das Chinon Q_B, wird nach zweifacher Reduktion protoniert und dissoziiert als Q_BH_2 vom RC ab. Die Chinon-bindungsstelle im RC wird von nicht reduziertem Q_B aus einem „Chinonpool“ in der Membran wieder besetzt. Das reduzierte und protonierte Chinon bildet das erste Glied einer zyklischen Elektronen-Transportkette, wobei das Elektron über mehrere Cytochrome zurück an seine Ursprungsstelle gebracht wird und gleichzeitig Protonen vom Cytoplasma zum Periplasma transportiert werden.

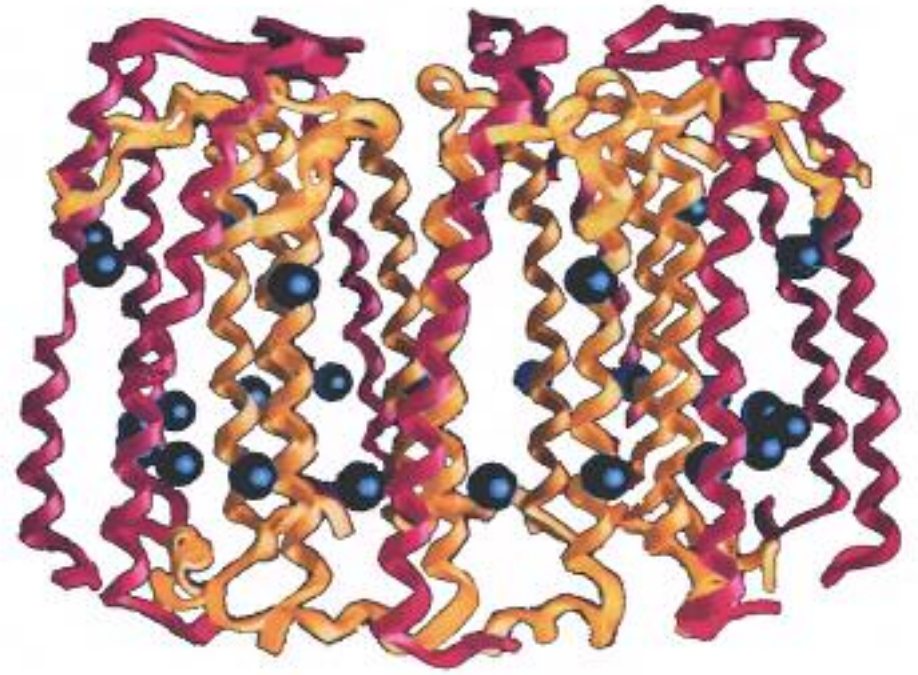
Der so entstandene Protonengradient wird unter Herstellung des energiereichen Adenosintriphosphats (ATP) aus Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat, das durch das Enzym ATP-Synthease katalysiert wird, wieder abgebaut. Die Photosynthese kann also als lichtgetriebener zyklischer Elektronenfluss bezeichnet werden, der eine Protonenpumpe zur Synthese von ATP antreibt.

1.3 Struktur von Lichtsammlerkomplexen aus Purpurbakterien

Sowohl LH1 als auch LH2 können aus verschiedenen Purpurbakterien gewonnen werden und sind bereits seit längerer Zeit biochemisch [Zuber & Cogdell 1995], biophysikalisch [van Grondelle et al. 1994] und durch Mutagenese der Bindungstaschen [Hunter 1995] gut untersucht. Seit wenigen Jahren sind für drei periphere Licht-sammlerkomplexe - den B800-850-Komplex aus *Rps. acidophila* 10050 [McDermott et al. 1995], den B800-850-Komplex aus *Rs. molischianum* [Koepke et al. 1996] und den B800-820-Komplex aus *Rps. acidophila* 7050 [Mc Luskey et al. 2001] - hochaufgelöste Röntgenstrukturen, und für den Kernkomplex aus *Rs. rubrum* eine niederaufgelöste Struktur [8.5Å, Karrasch et al. 1995], verfügbar. Das Bauschema ist in den drei Antennen-Komplexen ähnlich: lichtabsorbierende Pigmente Bakteriochlorophyll a (BChl) und verschiedene Carotinoide sind nicht-kovalent an zwei niedermolekulare, helikale, die Membran nur einmal durchspannende Apoproteine, α und β genannt, gebunden [Zuber & Cogdell 1995]. Dabei sind stöchiometrisch pro αβ-Monomer, abhängig von Spezies und Antennentyp, 2-3 (selten 4) Bakteriochlorophylle und 1-2 Carotinoide [Brunisholz 1992] gebunden. Diese Sub-Komplexe aggregieren zu toroidalen Holo-Komplexen aus 8-16 gleichartigen Elementen. Unveröffentlichte Ergebnisse von R.

Cogdell, deuten darauf hin, dass dieses Bauprinzip auch in Antennenkomplexen anderer Purpurbakterien realisiert ist.

Cytoplasma



Periplasma

Bild 1-3: Anordnung der Proteine α (rot) und β (gelb) von der intracytoplasmischen Membran aus gesehen (oben befindet sich das N-terminale Ende) aus *Rps. acidophila* 10050; die Kugeln stehen für die Zentren (= Mg) derBChl [McDermott et al. 1995]

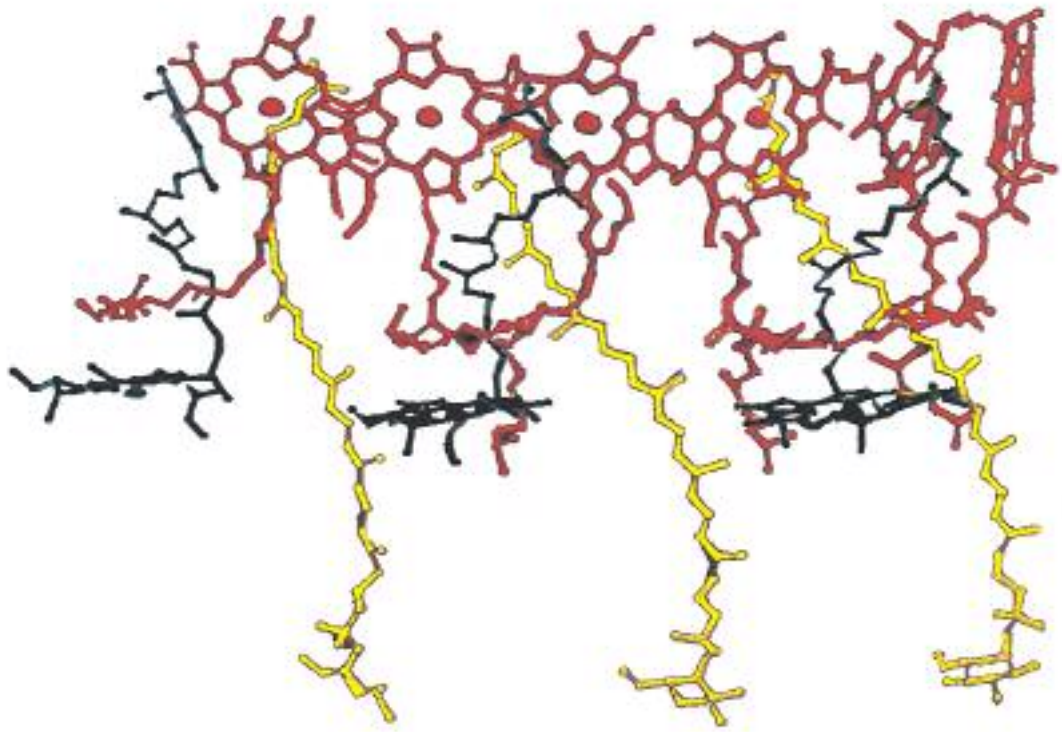


Bild 1-4: Anordnung der Pigmente im peripheren Antennenkomplex B800-850 aus *Rps. acidophila* 10050; BChl-B800: schwarz; BChl-B850: rot; Carotinoide: gelb. Gleiche Sicht wie in Bild 1-3 [McDermott et al. 1995].

Die hochaufgelöste Röntgenstruktur des LH2 von *Rps. acidophila* 10050 [McDermott et al. 1995] (Bild 1-1; Bild 1-3; Bild 1-4) zeigt zwei konzentrische Zylinder aus neun α- und neun β-Untereinheiten. Zwischen diesen beiden Proteinschichten befindet sich ein Ring aus 18 dachziegelartig gepackten, dimeren BChl, die der Absorption bei 850 nm zugeordnet werden können. Diese sind über Mg an ein Histidin des Proteins gebunden und senkrecht zur Membran orientiert. Zwischen den neun β-Untereinheiten befinden sich jeweils neun weitere BChl. Sie werden ebenfalls über Mg an ein Methionin des jeweiligen α-Apoproteins gebunden, und ihre Orientierung verläuft parallel zur Membran. Diese monomeren vorliegenden BChl sind für die Absorption bei 800 nm verantwortlich. Die Carotinoide (hauptsächlich Rhodopinglucosid, wobei noch nicht geklärt ist, ob es sich dabei um 1 oder um 2 Carotinoide pro Monomer handelt) weisen eine gestreckte Konformation auf und spannen sich senkrecht zur Membran durch den gesamten Komplex.

Die Struktur des peripheren Antennenkomplexes B800-820 aus *Rps. acidophila* 7050 besitzt große Ähnlichkeiten zum B800-850-Komplex aus *Rps. acidophila* 10050 [Mc Luskey et al. 2001]. Die augenfälligsten Unterschiede liegen in der Anordnung der Phytyl-Ketten des BCh-B850 und des BChl-α-B820 und der Rotation der Acetyl-Gruppe des BChl-β-B820 um 48°

bzw. 45° zur Ebene des Makrozyklus und nicht um 14 und 24° wie es bei BChl-B850 aus *Rps. acidophila* 10050 der Fall ist. Damit lässt sich auch die spektrale Verschiebung von 850 auf 820 nm erklären [Gudowska-Nowak et al. 1990].

Der LH2-Komplex aus *Rs. molischianum* weist etliche Gemeinsamkeiten, aber auch einige Unterschiede zur peripheren Antenne aus *Rps. acidophila* 10050 auf [Koepke et al. 1996]. So findet man auch hier zwei konzentrische Zylinder, gebildet aus den Proteinuntereinheiten, nur dass es sich bei *Rs. molischianum* um acht und nicht wie bei *Rps. acidophila* um neun Protomere handelt. Zwischen den Apoproteinen befindet sich auch hier ein Ring aus dimeren BChl, denen sich die Absorption bei 850 nm zuordnen lässt, die durch Mg an Histidine der Apoproteine gebunden werden und die senkrecht zur Membran orientiert sind. Allerdings handelt es sich auch hierbei, wie es die Anzahl der Apoproteine schon vermuten ließ, um 16 BChl und nicht um 18. Die 8 BChl-B800 - sind ebenfalls zwischen den β-Untereinheiten lokalisiert, die Anordnung ist aber deutlich unterschiedlich. Das BChl-B800 wird hier über eine Asparaginsäure an das α-Apoprotein gebunden, und die Orientierung zur Membran ist nicht parallel, sondern um 38° gekippt. Bei den Carotinoiden handelt es sich in *Rs. molischianum* um ein Lycopin, während *Rps. acidophila* ein Rhodopinglucosid besitzt. Die Orientierung der Carotinoide ist ähnlich, und auch hier konnte das zweite Carotinoid noch nicht lokalisiert werden.

Aus den gefundenen LH2 Strukturen von *Rps. acidophila* 10050 und *Rs. molischianum* als Nonamer bzw. Oktamer geht hervor, dass die Ringgröße der peripheren Lichtsammlerkomplexe je nach Art variieren kann.

1.4 Zusammensetzung und Funktion der Proteine in den Antennen

Die natürlich vorkommenden Aminosäuren sind für sichtbares Licht durchlässig und scheinen auch, mit wenigen Ausnahmen wie Cystein und Tyrosin [Huber 1989; Babcock 1993], als Einelektronenüberträger ungeeignet zu sein. In biologischen Systemen dienen somit im Allgemeinen Kofaktoren, d.h. Pigmente und Metallionen als Akzeptoren für Licht oder als redoxaktive Elemente. Während die entsprechenden Eigenschaften der Protein-Pigment-Komplexe primär durch die physikalisch-chemischen Merkmale der Kofaktoren bestimmt werden, übt der Proteinanteil einen entscheidenden modulierenden Einfluss auf deren spektrale Eigenschaften und das Redoxverhalten aus. Zudem dient das Protein auch als Matrix zur Positionierung der Kofaktoren.

Die Kern-Antenne (LH1) wie auch die periphere Antenne (LH2) sind integrale Membranproteine, die im Verhältnis 1:1 aus je zwei Proteinuntereinheiten α und β aufgebaut sind (Bild 1-1; Bild 1-3). Die Untereinheiten besitzen ein Molekulargewicht zwischen 5 und 7

kDa. Sie besitzen eine ähnliche Domänenstruktur aus polaren C- und N-terminalen Sequenzen, getrennt durch eine Sequenz hydrophober Aminosäuren, die eine membrandurchspannende α-Helix aufbauen [Brunisholz & Zuber 1992; Zuber 1993; Loach et al. 1994]. Innerhalb verschiedener Arten sind sie teilweise homolog und werden im Intramembranbereich über van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrücken-bindungen und möglicherweise auch durch die Bindung an das Pigment der anderen Untereinheit zusammengehalten.

1.5 Zusammensetzung und Eigenschaften der Kofaktoren in LH2

In das Proteingerüst eingebettet sind die Kofaktoren, die für die eigentlichen photo-physikalischen und chemischen Funktionen der Lichtsammlerkomplexe verantwortlich sind. In den Antennen von Purpurbakterien findet man hauptsächlich Bakterio-chlorophyll a (BChl) und eine Reihe unterschiedlicher Carotinoide.

1.5.1 Die Rolle der Bakteriochlorophylle in den Antennen

In Bild 1-5 ist die Strukturformel von Bakteriochlorophyll a (BChl) unter Kenn-zeichnung der Molekülachsen x und y dargestellt.

Das Tetrapyrrolsystem von BChl (Pyrrolringe A-D in Bild 1-5) ist ein 7-, 8-, 17-, 18-Tetrahydro-Porphyrin mit ankondensiertem isozyklischem Pentanonring (Ring E in Bild 1-5) und einem Magnesium(II)-Ion als Zentralatom. Die neun Kohlenstoff-Kohlenstoff und Kohlenstoff-Stickstoff-Doppelbindungen sind konjugiert, was die π-Elektronen über weite Teile des Tetrapyrrol-Rings delokalisiert. BChl hat deshalb sehr starke Absorptionsbanden im nahen UV- und NIR-Bereich des Spektrums. Es gehört zu den natürlichen Farbstoffen mit einem der größten Extinktionskoeffizienten (~105 $M^{-1}cm^{-1}$). An C-3 besitzt es eine Acetyl-Gruppe und die Propionsäure-Seitenkette an Position C-17 ist mit einem langkettigen hydrophoben Alkohol (meist Phytol oder Geranylgeraniol) verestert, die eine Verankerung des Pigments im Proteingerüst ermöglicht.

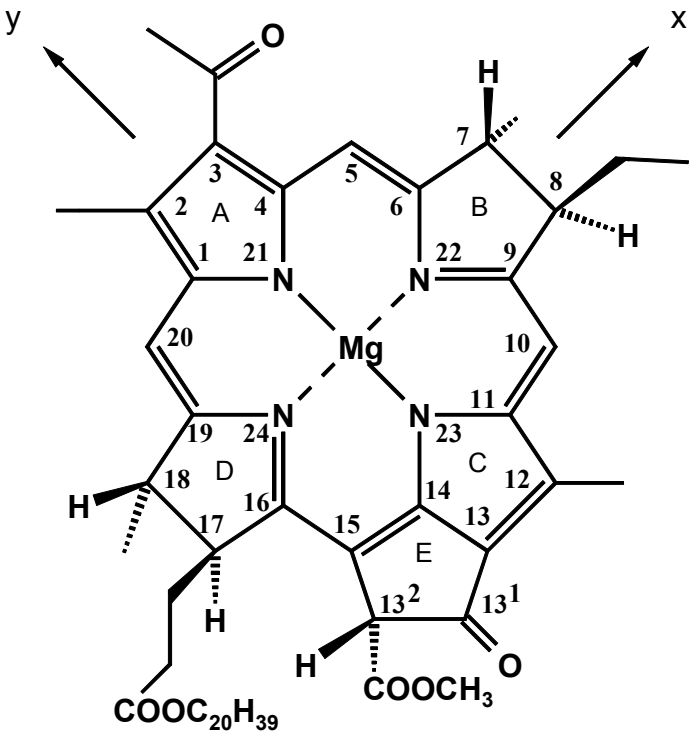


Bild 1-5: Strukturformel von Bakteriochlorophyll a (Numerierung nach IUPAC-IUB) unter Kennzeichnung der Molekülachsen x und y.

Bakteriochlorophylle erfüllen in den Antennen mehrere Aufgaben: Sie absorbieren einmal das Licht. Durch die Bindung der Pigmente an die Apoproteine und die Pigment-Pigment-Wechselwirkungen werden die spektralen Eigenschaften modifiziert (z.B. Absorption des BChl bei 800 nm, 850 nm im LH2 und BChl bei 875 nm im LH1, gegenüber 770 nm in organischem Lösungsmittel). Dadurch wird eine bessere Ausnutzung des natürlichen Lichtspektrums ermöglicht.

Zudem sind die BChl für den Energietransfer zwischen den Antennen und den RC verantwortlich. Der hierarchische Aufbau der Antennensysteme gewährleistet dabei einen gerichteten Energietransfer von den peripheren Antennenpigmenten BChl-800 und BChl-850 auf das energetisch niedriger liegende BChl-875 der Kern-Antenne, wodurch die Anregungsenergie in der Nähe des RC konzentriert wird (Kapitel 1.2) [Trissl 1993]. Die Anregungsenergie bleibt dadurch, im Gegensatz zur Situation in Aggregaten, weitgehend erhalten, da strahlungslose Relaxationsprozesse auf bisher nicht geklärte Weise durch die Bindung ans Protein unterdrückt werden.

Weiterhin haben die Bakteriochlorophylle einen großen strukturellen Einfluss auf die Komplexe.

1.5.2 Die Rolle der Carotinoide in den Antennen

Neben BChl verfügen die Antennen der Purpurbakterien auch noch über Carotinoide als photosynthetische Pigmente, die aber, im Gegensatz zu den BChl, nicht unbedingt notwendig für den Aufbau eines funktionierenden Photosyntheseapparats sind. Dies beweist eine Reihe von carotinoidfreien Mutanten, die bei geringen Beleuchtungs-intensitäten ungehindert phototroph wachsen können [Siefermann-Harms 1987; Sistrom 1978; Davidson & Cogdell 1981]. Die Carotinoidbindung ist zudem nur zu einem bestimmten Grad spezifisch [Hunter et al. 1994; Yurkov et al. 1993; Noguchi et al. 1990; Davidson & Cogdell 1981]. In Abhängigkeit von Wachstumsbedingungen und Wachstumsphase variiert der Carotinoidgehalt stark [Cogdell et al. 1981; Schwerzmann & Bachofen 1989].

Die Carotinoide der Purpurbakterien sind fast ausschließlich offenkettig und besitzen eine weitgehend ungestörte all-trans-Struktur mit einer Torsion verteilt über die ganze Länge [Iwata et al. 1985; Hayashi et al. 1989; Noguchi et al. 1990]. Innerhalb der Rhodospirillaceae findet man Carotinoide der Spheroiden-Serie (*Rhodobacter* und verwandte Gattungen) und Carotinoide der Spirilloxanthin-Serie (alle anderen Rhodo-spirillaceae) [Iwata et al. 1985; Hayashi et al. 1989; Noguchi et al. 1990].

Kennzeichnend für die Carotinoide ist eine sehr kurze Lebensdauer der angeregten Zustände aufgrund einer schnellen, strahlungslosen Relaxation (1^1B_u: 100 - 300 fs, 2^1A_g: 2 - 10 ps) [Shreve et al. 1991; Wasielewski et al. 1986, Wasielewski & Kispert 1986; Gillbro & Cogdell 1989; Cogdell et al. 1992]. Sie zeigen deshalb nahezu keine Fluoreszenz [Gillbro & Cogdell 1989; Cogdell et al. 1992; Cogdell & Frank 1987; Mimuro et al. 1992; Siefermann-Harms 1987; Koyama 1991]. Während aus diesem Grunde ein Energietransfer nach Förster ineffizient ist, kann er bei großer räumlicher Nähe, die z.B. in den bakteriellen Antennen gegeben ist, durch Elektronentransfer-Mechanismen mit hoher Quantenausbeute auf andere Pigmente ermöglicht werden [Frank et al. 1999] .

Die Carotinoide erfüllen in den Antennen folgende Funktionen: Wegen ihrer ausgeprägten Absorption zwischen einer Wellenlänge von 400 - 500 nm können sie Licht in einem Bereich einfangen, in dem BChl eine sehr geringe Absorption aufweist und die Anregungsenergie an diese weiterleiten. Die Carotinoide dienen somit als akzessorische Antennenpigmente. Die Quantenausbeute des Energietransfers (ϕ_{EET}) von den Carotinoiden zu den BChl ist, artspezifisch und abhängig vom Antennentyp, sehr unterschiedlich [Goedheer, 1959; Iwata et al. 1985; Cogdell et al. 1992; Frank et al. 1999]. Bei *Rb. sphaeroides* liegt die ϕ_{EET} in der B875 bei > 70 % und in der B800-850 bei nahezu 100% [Kramer et al. 1984a & b; Cogdell et al. 1992, Lozano et al. 1990; Frank et al. 1999]. Unterschiede im Energietransfer haben ihre Ursache sowohl in der Art der Bindung der Carotinoide in den Antennenproteinen [Iwata et al. 1985; Hayashi et al. 1989; Noguchi et al. 1990; Koyama 1991] als auch in der Art der einzelnen Carotinoide [Noguchi et al. 1990; Frank 1993; Davidson & Cogdell 1981; Cogdell

et al. 1981; Frank et al. 1999].

Außerdem dienen die Carotinoide als Schutzpigmente vor photodynamischen Prozessen, die durch Triplett-Bildung innerhalb der BChl ausgelöst werden [Siefermann-Harms 1987; Cogdell & Frank 1987; Frank et al. 1993, Koyama 1991, Ghosh et al. 1984; Frank et al. 1999]. Diese Funktion erfüllen sie, indem sie entweder als „trap“ für die Triplett-Anregungsenergie der BChl dienen, oder indem sie den bereits gebildeten Singulett-Sauerstoff quenchen.

Die Carotinoide sind auch wichtige Strukturelemente in den Antennenkomplexen. Diese Rolle der Carotinoide wird nicht nur in der erhöhten Sensibilität carotinoidfreier Antennen gegenüber Proteasen [Wiemken & Bachofen 1985; Brunisholz et al. 1986; Webster et al. 1980] oder bei Solubilisierung durch Detergens [Miller et al. 1987; Chang et al. 1990; Theiler et al. 1984; Zurdo et al. 1993] deutlich, sondern auch dadurch, dass die Carotinoide für den Aufbau und die Integration der peripheren Antenne in die Membran eine wichtige Rolle spielen [Lang & Hunter 1994; Schwerzmann & Bachofen 1989; Frank et al. 1999].

1.5.3 Unterschiede zwischen freien und antennengebundenen Pigmenten

In den Antennen sind die Pigmente - wie in den Kapiteln 1.3 und 1.4 bereits erwähnt – sehr spezifisch an die Polypeptide gebunden. Dadurch werden die spektralen Eigenschaften modifiziert und unterscheiden sich deutlich von denen monodispers gelöster freier Pigmente in Detergenz/Puffer oder organischen Lösungsmitteln (Bild 1-6).

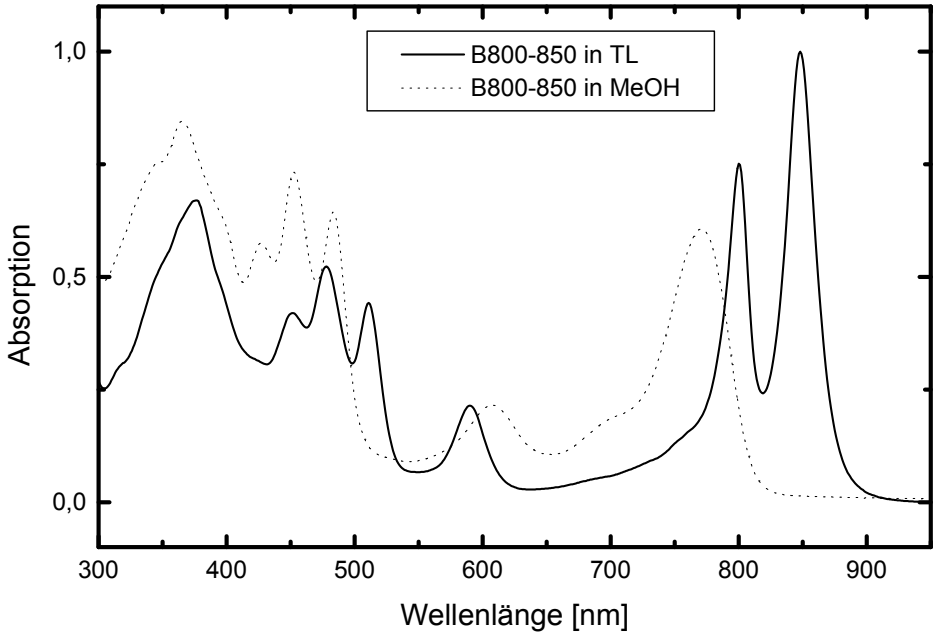


Bild 1-6: Absorptionsspektren von LH2 aus *Rb. sphaeroides* in TL-Puffer, und des Pigmentextrakts in Methanol.

Die Absorptionsbanden der Pigmente in Antennen sind, wie Bild 1-6 zeigt, gegenüber den freien Pigmenten in Detergenslösungen oder organischen Lösungsmitteln deutlich rotverschoben. Die Q_y-Banden der BChl zeigen eine Verschiebung bis 100 nm (etwa 1500 cm^{-1}) und die der Carotinoid-Banden von etwa 15 - 20 nm (≈ 500 - 700 cm^{-1}) [Sauer 1978; Sauer & Austin 1978]. Gleichzeitig beobachtet man einen starken Hyper-chromismus in den langwelligen Q_y-Banden [Visschers et al. 1991; Scherz & Parson 1984, 1986].

Ursachen dieser spektralen Unterschiede sind Pigment-Pigment-Wechselwirkungen (excitonische Kopplungen) [Scherz & Parson 1984, 1986; Sauer et al. 1987; Nagarajan et al. 1996; Hu et al. 2002; Ihalainen et al. 2001] und Protein-Pigment-Wechsel-wirkungen, die die spektralen Eigenschaften der Pigmente modifizieren [Brunisholz & Zuber 1992; Zuber 1993; Fowler et al. 1994; Olsen et al. 1994].

Durch Punktmutationen innerhalb einer konservierten Region mit aromatischen Aminosäuren in der B800-850 [Hunter et al. 1993; Fowler et al. 1992, 1994] aus *Rb. sphaeroides* konnten auch Blauverschiebungen von 10 nm direkt mit dem Verlust einer Wasserstoffbrücken-Bindung des BChl mit Tyrosin korreliert werden [Fowler et al. 1994], ohne dass in den Raman-Daten andere Veränderungen in der Pigmentumgebung erkennbar wurden. Es ist aber ausgesprochen schwierig, Veränderungen nur in der Protein-Pigment-Wechselwirkung zu erzeugen, ohne dadurch auch Konformations-änderungen [Olsen et al. 1994] oder Pigment-Pigment-Wechselwirkungen zu beeinflussen, welche dann ebenfalls wieder zu spektralen Verschiebungen führen können.

Freie und antennengebundene Pigmente unterscheiden sich aber vor allem im Circulardichroismus (Bild 1-7).

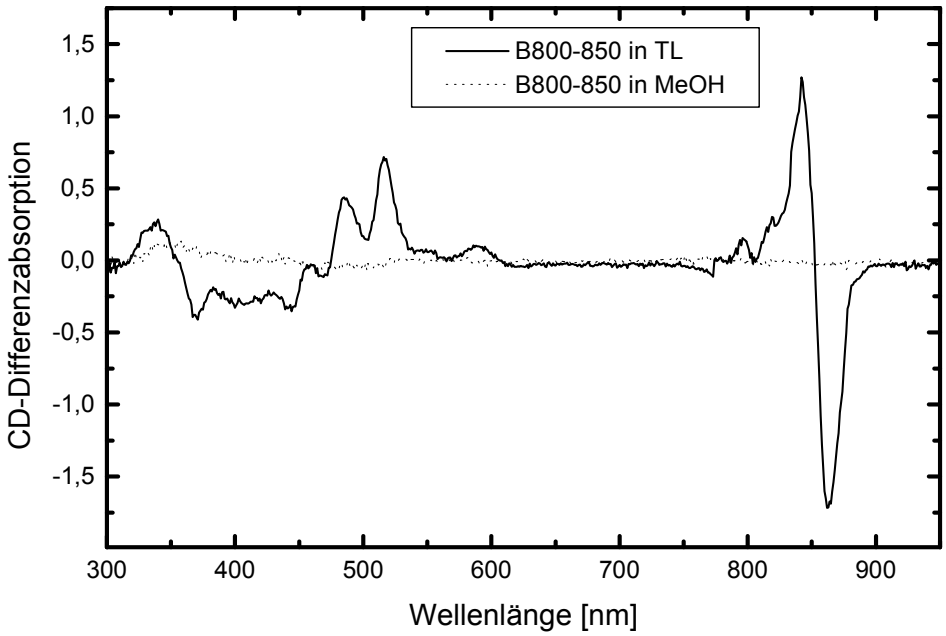


Bild 1-7: CD-Spektren von LH2 aus *Rb. sphaeroides* in TL-Puffer und des Pigmentextrakts in Methanol.

Der Circulardichroismus (CD) ist eine spektroskopische Methode, durch die chirale Strukturen sichtbar werden [Cantor 1980]. Da die chiralen Zentren im BChl und, soweit vorhanden, in den Carotinoiden kaum einen Einfluss auf dessen Konjugationssystem haben, zeigen freie Pigmente nahezu kein CD-Signal. Die Antennen zeigen dagegen intensive Banden im Bereich der Carotinoide und der BChl (Bild 1-7), die sich in den langwelligen BChl-Banden hauptsächlich auf excitonische Wechselwirkungen zurückführen lassen [Zurdo et al. 1991; Lozano et al. 1990; Kingma et al. 1985], während sie bei den Banden der Carotinoide und der kurzwelligen Banden der BChl noch nicht geklärt sind.

Diese excitonischen Wechselwirkungen werden in Circulardichroismus (CD)-Spektren dadurch sichtbar, dass CD-Banden von zusammengehörigen Excitonenbanden stark erhöht sind (ca. 10 – 100 fach). Im einfachsten Fall besitzen sie die gleiche Intensität, aber ein umgekehrtes Vorzeichen [Cantor 1980], sie werden konservativ genannt [Sauer 1978; Sauer & Austin 1978].

1.6 Pigmentaustausch

Wichtige Schritte der Elementarreaktionen der Photosynthese konnten in den letzten Jahren durch eine Kombination strukturanalytischer, spektroskopischer und biochemischer

Techniken aufgeklärt werden. Im Bereich der peripheren Lichtsammler-komplexe existieren hochaufgelöste Strukturen von *Rps. acidophila* [Mc Dermott et al 1995; Mc Luskey et al 2001] und *Rs. molischianum* [Koepke et al 1996]. Allein die Kenntnis der Struktur ermöglicht allerdings noch keine hinreichende Beschreibung der Funktion. Dazu sind eine Reihe zusätzlicher biochemischer und spektroskopischer Untersuchungen notwendig, und zwar sowohl an den nativen als auch an spezifisch modifizierten Systemen mit z.B. anderen Redox-, Fluoreszenz- oder Absorptions-eigenschaften. Die gezielte Veränderung des Proteins, d.h. der Aminosäuresequenz, ist durch ortsspezifische Mutagenese möglich, wie es Hunter für die Lichtsammler-komplexe aus *Rb. sphaeroides* gezeigt hat [Hunter 1995]. Für die gezielte Modifikation der Chromophore kommen prinzipiell fünf Verfahren in Frage [Scheer & Struck 1993]:

- direkte chemische Modifikation, z.B. Reduktion des Chromophors mit $NaBH_4$
- gezielte Mutagenese der Chromophorliganden
- genetische Manipulation des Biosynthesewegs der Chromophoren
- Rekonstitution der Komplexe aus isolierten Protein-Untereinheiten und modifizierten Kofaktoren
- direkter Pigmentaustausch

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich zum einen mit dem direkten Pigmentaustausch. Diese Methode wurde von Bandilla für die peripheren Antennenkomplexe aus *Rb. sphaeroides* entwickelt [Bandilla et al 1998]. Dabei ist es möglich, durch Absenken des pH-Wertes von 8.0 auf 5.0 das für die Absorption bei 800 nm verantwortliche monomere Bakteriochlorophyll (BChl-B800) selektiv und vollständig aus dem Komplex zu entfernen und durch anschließende Erhöhung des pH-Wertes ein im Überschuss zugeführtes modifiziertes Pigment in die Bindungstasche zu rekonstituieren. Die BChl-B800 Bindungstasche konnte dabei aber nur maximal zu 50 % mit modifiziertem Pigment besetzt werden.

Zum anderen wird in dieser Arbeit auf die direkte chemische Modifikation von Pigmenten in peripheren Lichtsammlerkomplexen mit $NaBH_4$ eingegangen, die schon von Chadwick [Chadwick et al 1987], sowie Goodwin und Jackson [Goodwin & Jackson 1993] auf LH2-Komplexe angewendet wurde.

Die Ergebnisse dieser Pigment-Modifikationsexperimente erlauben Aussagen über die Struktur und Selektivität der pigmentbindenden Proteintaschen und ermöglichen die Einführung von Chromophoren mit unterschiedlichen funktionsrelevanten Eigenschaften, wie z.B. Redoxpotentiale, Absorption, Relaxation angeregter Zustände oder Bindungen ans Protein.

1.7 Aufgabenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Grundlagen geschaffen, um die Präparation modifizierter LH2-Komplexe zu ermöglichen. Im Einzelnen wurden dazu folgende Arbeiten durchgeführt:

- Vergleichende spektrale Untersuchungen von peripheren Antennen verschiedener Purpurbakterien besonders bei *Rb. sphaeroides, Rs. molischianum, Rps. acidophila* 10050 und 7750)
- Optimierung des bestehenden Rekonstitutionsverfahrens zur Modifikation des BChl-B800 aus *Rb. sphaeroides* mit modifizierten BChl-Derivaten.
- Etablierung der Rekonstitutionsmethode bei LH2-Komplexen anderer Purpurbakterien.
- Veränderung der BChl in LH2 verschiedener Purpurbakterien durch direkte chemische Modifikation innerhalb der Komplexe.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Präparationen

Alle Arbeiten wurden mit analysenreinen Chemikalien (p.a.) und entionisiertem Wasser durchgeführt.

Im Allgemeinen wurden die Arbeitsschritte im Grünlicht und bei einer Temperatur von 4 °C ausgeführt.

2.1.1 Anzucht der Bakterien

Die Bakterien wurden bis zur Benutzung in Agarosestichen (15 g Agarose/1 l Medium) bei RT und zusätzlich in 50 %-igen Glyzerinkulturen bei –70 °C gelagert. Vor der Verwendung wurde ihre Reinheit durch Ausplattieren auf Agarose (15 g Agarose/1 l Medium) überprüft.

Für die Flüssigkulturen wurden die Stiche mit Medium überschichtet, bzw. die Glyzerinkulturen auf das gleiche Volumen Medium überimpft und, soweit nicht anders erwähnt, mit Licht aus herkömmlichen Glühbirnen (60 W) bestrahlt, das durch eine rote Plexiglasscheibe (Kantenfilter für Licht mit Wellenlänge >600 nm) gefiltert wurde. Die Lichtintensität betrug etwa 50 µmol s^{-1} m^{-2}, die Wachstumstemperatur 27 °C. Nach drei bis vier Tagen waren die Bakterienkulturen dicht genug angewachsen, so dass sie in 500 ml Flaschen überführt werden konnten. Diese frisch angeimpften Bakterien-kulturen wurden etwa nach 12 Stunden Dunkelheit, um den im Medium enthaltenen Sauerstoff veratmen zu lassen, ins rot gefilterte Licht gestellt. Sie wurden nach vier Tagen, was unter den gegebenen mikroaeroben Bedingungen der mittleren bis späten logarithmischen Wachstumsphase entsprach, geerntet oder neu überimpft. Es ließen sich dabei etwa 5 g Bakterien (feucht) pro 1 Liter Medium ernten. Die Zellen wurden mit einer Padberg-Zentrifuge (Typ LE, Telemecanique) abzentrifugiert und konnten, wenn sie nicht direkt verarbeitet wurden, bei -20 °C gelagert werden.

2.1.1.1 Anzuchtsbedingungen für *Rhodobacter sphaeroides*

Rhodobacter (Rb.) sphaeroides 2.4.1 wurde in einem modifizierten *Rhodospirillum* Medium mit Malat anstelle von Succinat als Kohlenstoffquelle angezogen [Malik 1984]. Die verwendeten Chemikalien und Lösungen sind tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 2-1 bis Tabelle 2-3).

Substanz	**Konzentration [g/l]**	**Molmasse [g/Mol]**	**Konzentration [mM]**
Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4	0.5	174.18	2.87
Magnesiumsulfat $MgSO_4$ x $7H_2O$	0.4	246.47	1.62
Natriumchlorid NaCl	0.4	58.44	6.84
Ammoniumchlorid NH_4Cl	0.4	50.47	7.93
Calciumchlorid $CaCl_2$ x $2H_2O$	0.05	147.02	0.34
Äpfelsäure $C_4H_6O_5$	1.5	134.09	11.19
Hefeextrakt	2		
Eisencitrat (Tabelle 2-2)	6 (ml/l)		
Spurenelemente (Tabelle 2-3)	1 (ml/l)		

Tabelle 2-1: Chemikalien für das Medium von *Rb. sphaeroides* 2.4.1

Das Medium wurde mit 5 M NaOH auf einen pH von 6.9 eingestellt und 30 min bei 120 °C im Autoklaven sterilisiert.

Substanz	**Konzentration [g/l]**	**Molmasse [g/Mol]**	**Konzentration [mM]**
Eisensulfat $FeSO_4$ x $7H_2O$	0.608	278.02	2.19
Ammoniumsulfat $(NH_4)_2SO_4$	0.528	132.14	4.00
Zitronensäure $C_6H_8O_7$	0.168	192.13	0.87

Tabelle 2-2: Eisencitrat-Lsg. für *Rb. sphaeroides* 2.4.1, *Rps. acidophila, Rs. molischianum, Rps. palustris* French, *Rps. palustris* DSM und *Rbv. gelatinosus*

Die Eisencitrat-Lösung wurde mit 5 M NaOH auf einen pH von 6.5 eingestellt.

Substanz	Konzentration [g/l]	Molmasse [g/Mol]	Konzentration [mM]
Zinksulfat $ZnSO_4$ x $7H_2O$	0.1	287.54	0.35
Manganchlorid $MnCl_2$ x $4H_2O$	0.03	197.91	0.15
Borsäure H_3BO_3	0.3	61.83	4.85
Cobaltchlorid $CoCl_2$ x $6H_2O$	0.2	237.93	0.84
Kupferchlorid $CuCl_2$ x $2H_2O$	0.01	170.48	0.06
Nickelchlorid $NiCl_2$ x $6H_2O$	0.02	237.71	0.08
Natriummolybdat Na_2MoO_4 x $2H_2O$	0.03	241.95	0.12

Tabelle 2-3: Spurenelemente für *Rb. sphaeroides*

2.1.1.2 Anzuchtsbedingungen für *Rhodopseudomonas acidophila*

Rhodopseudomonas (Rps.) acidophila 7750 und *Rps. acidophila* 10050 wurden in einem Medium angezogen, das von Pfennig entwickelt wurde [Pfennig 1969] und Succinat als Kohlenstoffquelle enthält. Die an Schwachlicht und kühlere Temperaturen angepasste mikroaerobe Kultur von *Rps. acidophila* 7750 wurde mit Licht aus 40 W Glühbirnen bestrahlt (20 µmol s^{-1} m^{-2}) und bei einer Temperatur von 20 °C kultiviert, *Rps. acidophila* 10050 bei Standardbedingungen. Die verwendeten Chemikalien und Lösungen sind in Tabelle 2-2; Tabelle 2-4 und Tabelle 2-5 zusammengefasst:

Substanz	Konzentration [g/l]	Molmasse [g/Mol]	Konzentration [mM]
Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4	1	136.09	7.35
Magnesiumsulfat $MgSO_4$ x $7H_2O$	0.4	246.47	1.62
Natriumchlorid NaCl	0.4	58.44	6.84
Natriumsuccinat $C_4H_4Na_2O_4$ x $6H_2O$	1.5	270.15	5.55
Ammoniumchlorid NH_4Cl	0.5	50.47.	9.91
Calciumchlorid $CaCl_2$ x $2H_2O$	0.05	147.02	0.34
Eisencitrat (Tabelle 2-2)	3 (ml/l)		
Spurenelemente (Tabelle 2-5)	10 (ml/l)		

Tabelle 2-4: Chemikalien für das Medium von *Rps. acidophila*

Das Medium wurde mit konzentrierter HCl auf einen pH von 5.2 eingestellt und 30 min bei 120 °C im Autoklaven sterilisiert.

Substanz	Konzentration [mg/l]	Molmasse [g/Mol]	Konzentration [mM]
Natrium EDTA $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$ x $2H_2O$	500	372.24	1.34
Eisensulfat $FeSO_4$ x $7H_2O$	10	278.02	0.04
Manganchlorid $MnCl_2$ x $4H_2O$	3	197.91	0.02
Borsäure H_3BO_3	30	61.83	0.49
Cobaltchlorid $CoCl_2$ x $6H_2O$	29	237.93	0.12
Calciumchlorid $CaCl_2$ x $2H_2O$	1	147.02	0.01
Nickelchlorid $NiCl_2$ x $6H_2O$	2	237.71	0.01
Natriummolybdat Na_2MoO_4 x $2H_2O$	3	241.95	0.01

Tabelle 2-5: Spurenelemente für *Rps. acidophila*; die Lösung der Spurenelemente wurde mit konzentrierter HCl auf einen pH von 3-4 eingestellt.

2.1.1.3 Anzuchtsbedingungen für *Rhodospirillum molischianum, Rhodopseudomonas palustris* und *Rubrivivax gelatinosus*

Rhodospirillum (Rs.) molischianum DSM 119*,* sowohl die Starklicht, als auch die an Schwachlicht und kältere Temperaturen angepasste mikroaerobe (40 W Glühbirnen; 20 °C Wachstumstemperatur) Modifikation von *Rps. palustris* French, *Rps palustris* 2.1.6 und *Rubrivivax (Rbv.) gelatinosus* wurden mit Succinat als Kohlenstoffquelle unter permanentem Rühren kultiviert. Die verwendeten Chemikalien und Lösungen sind tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 2-2; Tabelle 2-6 und Tabelle 2-7):

Substanz	Konzentration [g/l]	Molmasse [g/Mol]	Konzentration [mM]
Natriumsuccinat $C_4H_4Na_2O_4$ x $6H_2O$	1	270.15	3.70
Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4	0.5	174.18	2.87
Magnesiumsulfat $MgSO_4$ x $7H_2O$	0.4	246.47	1.62
Natriumchlorid NaCl	0.4	58.44	6.84
Ammoniumchlorid NH_4Cl	0.4	50.47	7.93
Calciumchlorid $CaCl_2$ x $2H_2O$	0.05	147.02	0.34
Hefeextrakt	1		
Ethanol p.a C_2H_6O	0.5 (ml/l)	46.07	10.85
Eisencitrat (Tabelle 2-2)	3 (ml/l)		
Spurenelemente für (Tabelle 2-7)	1 (ml/l)		

Tabelle 2-6: Chemikalien für das Medium von *Rs. molischianum* DSM 119*, Rps. palustris* French, *Rps. palustris* 2.1.6 und *Rbv. gelatinosus*

Das Medium wurde mit 5 M NaOH auf einen pH von 6.8 eingestellt und 30 min bei 120 °C im Autoklaven sterilisiert.

Substanz	Konzentration [g/l]	Molmasse [g/Mol]	Konzentration [mM]
Zinksulfat $ZnSO_4$ x $7H_2O$	0.1	287.54	0.35
Manganchlorid $MnCl_2$ x $4H_2O$	0.03	197.91	0.15
Borsäure H_3BO_3	0.3	61.83	4.85
Cobaltchlorid $CoCl_2$ x $6H_2O$	0.2	237.93	0.84
Kupferchlorid $CuCl_2$ x $2H_2O$	0.01	170.48	0.06
Nickelchlorid $NiCl_2$ x $6H_2O$	0.02	237.71	0.08
Natriummolybdat Na_2MoO_4 x $2H_2O$	0.03	241.95	0.12

Tabelle 2-7: Spurenelemente für *Rs. molischianum* DSM 119*, Rps. palustris* French, *Rps. palustris* 2.1.6 und *Rbv. gelatinosus*

2.1.1.4 Anzuchtsbedingungen für *Chromatium purpuratum*

Chromatium (Chr.) purpuratum BN 5500 wurde in einem von Imhoff und Trüper modifizierten Pfennig-Medium für phototrophe Bakterien kultiviert, wobei zusätzlich Natriumchlorid, Natriumacetat, Natriumcarbonat, Hefeextrakt und Natriumthiosulfat anstelle von Natriumsulfit verwendet wurden [Imhoff & Trüper 1981]. Die verwendeten Chemikalien und Lösungen sind tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 2-8 bis Tabelle 2-10).

Substanz	Konzentration [g/l]	Molmasse [g/Mol]	Konzentration [mM]
Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4	1	174.18	5.74
Magnesiumsulfat $MgSO_4$ x $7H_2O$	3	246.47	12.17
Natriumchlorid NaCl	25	58.44	427.79
Ammoniumchlorid NH_4Cl	0.5	50.47	9.91
Calciumchlorid $CaCl_2$ x $2H_2O$	0.05	147.02	0.34
Natriumacetat CH_3COONa	25	82.03	304.77
Spurenelemente (Tabelle 2-6)	1 (ml/l)		

Tabelle 2-8: Chemikalien für das Medium von *Chr. purpuratum* BN 5500

Das Medium wurde 30 min bei 120 °C im Autoklaven sterilisiert.

Substanz	Konzentration [mg/l]	Molmasse [g/Mol]	Konzentration [mM]
Natrium EDTA $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$ x $2H_2O$	5200	372.24	13.97
Eisenchlorid $FeCl_2$ x $4H_2O$	2350	198.81	11.82
Zinkchlorid $ZnCl_2$	70	136.28	0.51
Manganchlorid $MnCl_2$ x $4H_2O$	100	197.91	0.51
Borsäure H_3BO_3	62	61.83	1.0
Cobaltchlorid $CoCl_2$ x $6H_2O$	190	237.93	0.8
Kupferchlorid $CuCl_2$ x $2H_2O$	13.4	170.48	0.08
Nickelchlorid $NiCl_2$ x $6H_2O$	24	237.71	0.1
Natriummolybdat Na_2MoO_4 x $2H_2O$	36	241.95	0.15
Natriumcarbonat Na_2CO_3	8.5	105.99	0.08

Tabelle 2-9: Spurenelemente für *Chr. purpuratum* BN 5500

Lösung	Konzentration [ml/l]	Molmasse [g/Mol]	Konzentration [mM]
2 % Vitamin B_{12} $C_{63}H_{88}CoN_{14}P$	1	1355.40	0.02
5 % Natriumhydrogencarbonat $NaHCO_3$	40	84.01	2.00
15 % Natriumthiosulfat $Na_2S_2O_3$	10	158.11	1.5
5 % Hefeextrakt (autoklaviert)	10		
2M Natriumcarbonat Na_2CO_3	1.35	105.99	0.03

Tabelle 2-10: Weitere Lösungen für *Chr. purpuratum* BN 5500; diese Lösungen wurden einmal sterilfiltriert (22 µm Filter von Schleicher & Schüll) und der Reihenfolge nach zu dem autoklavierten Medium gegeben.

2.1.2 Isolierung der LH2 aus Purpurbakterien

2.1.2.1 Isolierung der Chromatophore

Die frisch geernteten oder aufgetauten Zellen wurden in Tris-Puffer (20 mM Tris/HCl pH = 8.0) aufgenommen (50 ml/50 g Feuchtmasse), mit einer Spatelspitze DNAase I (Merck) versetzt und homogenisiert. Nach dem Aufbrechen der Zellen mit Hilfe einer French Press (SLM Aminco; 1000 Psi) oder eines Sonifiers (W-450 Branson; Puls-zyklus 50 %, Stufe 7, 30 min, 4° C) wurden die verbleibenden ganzen Zellen und große Zellbruchstücke abzentrifugiert (Kontron-Hermle: Centrikon-H401; Rotor: Kontron-Hermle A8.24; 10 min, 13 500 g, 4 °C). Die im Überstand verbleibenden Chromatophore wurden in einer Ultrazentrifuge (240 000 g, 90 min bei 4 °C; Ultra-zentrifuge LKB 2330 Ultraspin; Festwinkel-Rotor RP50T2) pelletiert, in Tris-Puffer

(20 mM Tris/HCl pH = 8.0) resuspendiert und dabei auf eine Absorption bei λ_{max} von 50 cm^{-1} (0.27 mM) eingestellt. Die Chromatophore konnten bei -20 °C gelagert werden, oder wurden unmittelbar weiterverarbeitet.

2.1.2.2 Isolierung der Lichtsammelkomplexe II

Die Chromatophore wurden solubilisiert, indem sie mit N-Lauryl-N,N-dimethyl-aminoxid (LDAO; Fluka) auf eine Endkonzentration von 1 % gebracht wurden. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei RT unter Rühren wurden die solubilisierten Chromatophore auf einen dreistufigen Saccharosedichtegradienten (1.2 M; 0.6 M und 0.4 M Saccharose in 20 mM Tris/HCl pH = 8.0, 0.1 % LDAO) aufgetragen und über Nacht bei 200 000 g und 4 °C zentrifugiert (Ultrazentrifuge LKB 2330 Ultraspin; Festwinkel-Rotor RP50T2). Es entstanden zwei Banden, von denen die Fraktion höherer Dichte den Kernkomplex LH1 und RC beinhaltet, während die Bande geringerer Dichte aus LH2 bestand. Die gesammelten LH2-Fraktionen wurden mit dem gleichen Volumen eines Tris-LDAO-Puffer (TL-Puffer: 20 mM Tris/HCl pH = 8.0, 0.1 % LDAO) verdünnt und zur Reinigung auf eine mit TL-Puffer äquilibrierte, DEAE-Zellulose-Säule (∅ = 3 cm; Länge ≈ 0.5 cm DEAE (Whatman)/0.54 µmol (100 ODml) aufgetragen. Dann wurde so lange mit TL-Puffer gespült, bis das Eluat farblos war. Der Antennenkomplex wurde mit einem Stufengradienten von NaCl in TL-Puffer beginnend mit 80 mM NaCl, in 10 mM Schritten bis 150 mM NaCl gesteigert, eluiert. Es wurde immer solange gespült, bis im Eluat zwischen 300 und 900 nm die Absorption $OD_{max} < 0.03$ cm^{-1} betrug. Bei etwa 150 mM NaCl begannen sich die Antennen von der DEAE-Zellulose zu lösen. Sie wurden dann mit 300 mM NaCl eluiert, um eine möglichst konzentrierte Antennenfraktion zu erhalten. Sie wurden bei –20 °C gelagert.

2.1.3 Rekonstitution von LH2 mit modifizierten Pigmenten

2.1.3.1 Optimierung der BChl-B800 Extraktion

Die Optimierung der Extraktion des BChl-B800 erfolgte durch geeignete Wahl des Detergens, der Antennenkonzentration, des pH-Wertes und der Inkubationstemperatur.

Für jeden dieser Parameter wurden mehrere Versuchsansätze gemacht. Zu jeweils 100 µl Antennenkomplex, mit einer Konzentration von 0.27 mM (OD = 50 cm^{-1}), gab man soviel 20 mM Tris/Acetat mit dem gewünschten Detergens und pH-Wert (im Bereich von 5.5 bis 3.0), dass die Probe eine Konzentration von 2.7 µM bis 10.8 µM (OD = 0.5 bis 2.0 cm^{-1}) aufwies. Der pH-Wert wurde überprüft und gegebenenfalls mit 0.5 M Essigsäure nachtitriert. Die Inkubationstemperatur wurde durch einen Kryostaten (Haake K20) konstant gehalten. Alle 15 min wurde ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Der Denaturierungsgrad der

Antenne wurde absorptionsspektroskopisch bestimmt, indem die Absorption bei λ_{max} = 850 nm vor und nach der Inkubation bestimmt wurde.

2.1.3.2 Optimierte Methode zur Entfernung der BChl-B800

LH2 wurde an eine, mit TL-Puffer äquilibrierte DEAE-Zellulose gebunden (∅ = 1.5 cm; Länge: ≈ 1.2 cm DEAE pro 0.54 µmol (100 ODml)) und mit 2-3 Säulenvolumen eines Tris/n-Dodecyl-β-maltosid-Puffers ($TD_{8.0}$-Puffer: 20 mM Tris/HCl pH = 8.0, 0.06 % n-Dodecyl-β-maltosid (DM; Biomol)) gespült. Danach wurde die Antenne mit 300 mM NaCl in einem sauren $TD_{4.3}$-(für *Rb. sphaeroides*) bzw. $TD_{4.5}$-Puffer (für *Rps. acidophila*) eluiert.

Die Probe wurde mit $TD_{4.3}$- bzw. $TD_{4.5}$-Puffer auf 5.4 µM (OD_{850} = 1 cm^{-1}) verdünnt, der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls mit 0.5 M Essigsäure auf den jeweils gewünschten pH-Wert nachtitriert. Der Ansatz wurde bei 30 °C etwa 1 h inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte durch Adsorption der Antenne an eine, mit $TD_{4.3}$- bzw. $TD_{4.5}$-Puffer äquilibrierte DEAE-Zellulose gebunden (∅ = 1.5 cm; Länge: ≈ 1.2 cm DEAE/ 0.54 µmol (100 ODml)). Es wurde solange mit 90 mM NaCl in saurem $TD_{4.3}$- bzw. $TD_{4.5}$-Puffer gespült, bis im Eluat zwischen 300 und 900 nm die Absorption auf OD_{max} < 0.03 gesunken war. Dann eluierte man die modifizierte Antenne mit 300 mM NaCl in $TD_{4.3}$- bzw. $TD_{4.5}$-Puffer. Diese Aufreinigung wurde so lange wiederholt, bis in der eluierten Antenne absorptionsspektroskopisch kein freies Pigment bei etwa 770 nm mehr zu erkennen war.

Man erhielt einen Antennenkomplex, bei dem die Bande bei 800 nm fehlt, die sogenannte p(850) bzw.p(820).

2.1.3.3 Optimierung der Rekonstitution des BChl-B800 mit BChl

Für die Optimierung der BChl-B800 Rekonstitution wurde BChl als Referenzpigment verwendet. Verschiedene Detergentien, Antennenkonzentrationen (im Bereich von 2.7 µM bis 21.6 µM (OD = 0.5 bis 4.0 cm^{-1})), Pigmentkonzentrationen (im Bereich von 1 bis 9-fachem molaren Überschuss), und Inkubationstemperaturen (im Bereich von 4 bis 45 °C) wurden hinsichtlich ihrer Eignung überprüft.

Für jeden dieser Parameter wurden mehrere Versuchsansätze gemacht. Zu jeweils 400 µl eines 0.11 mM (OD = 20 cm^{-1}) Antennenkomplexes p(B850) gab man so viel $TD_{8.0}$-Puffer, dass die Probe die gewünschte Antennenkonzentration aufwies. Verschiedene Mengen an BChl wurden nun in so viel Methanol aufgenommen, dass die Methanolmenge 10 % des Gesamtvolumens nicht überschritt, und zum Ansatz dazugegeben. Der pH-Wert wurde überprüft und gegebenenfalls mit 0.5 M NaOH nachtitriert. Die Inkubationstemperatur wurde durch einen Kryostaten konstant gehalten. Alle 15 min wurde ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Ließ sich keine Veränderung des Spektrums im Bereich der 800 nm - Bande

beobachten (etwa nach 2h), wurde der Denaturierungsgrad der kompletten Antenne absorptionsspektroskopisch bestimmt, indem die Absorption bei λ_{max} vor und nach der Inkubation bestimmt wurde. Die Aufreinigung erfolgte durch Adsorption des Komplexes an eine mit $TD_{8.0}$-Puffer äquilibrierte DEAE-Zellulose (Pasteurpipette: ∅ = 0.5 cm; Länge ≈ 1 cm DEAE pro 0.054 µmol (10 ODml)). Es wurde solange mit 90 mM NaCl in $TD_{8.0}$-Puffer gespült, bis im Eluat zwischen 300 und 900 nm die Absorption bei $OD_{max} < 0.03$ betrug. Dann eluierte man die modifizierte Antenne mit 300 mM NaCl in TD-Puffer (20 mM Tris/Acetat pH = 8.0, 0.06 % DM). Diese Aufreinigung wurde so oft wiederholt, bis in der eluierten Antenne absorptionsspektroskopisch kein freies Pigment mit einer Absorption bei etwa 770 nm mehr zu erkennen war. Die Rekonstitutionsrate wurde absorptionsspektroskopisch bestimmt, indem das Absorptions-Verhältnis der Banden bei 800 nm und 850 nm, vor und nach dem Absenken des pH-Wertes, gebildet wurde.

2.1.3.4 Optimierte Methode zur Rekonstitution mit modifizierten Pigmenten

Die p(850), eine modifizierte Antenne bei der die Bande bei 800 nm fehlt, wurde mit TD-Puffer (20 mM Tris/Acetat pH = 8.0, 0.06 % DM) auf 10.8 µM (OD = 2 cm^{-1}) verdünnt. Das in Methanol gelöste Pigment wurde in 6-fachem molaren Überschuss zugegeben. Dabei sollte die Methanolmenge 10 % des Gesamtvolumens nicht überschreiten. War das Pigment nicht in Methanol löslich, so wurde es zuvor in so wenig wie möglich Aceton angelöst und dann mit Methanol auf das Endvolumen verdünnt. Dabei sollte Aceton 1% des Gesamtvolumens nicht überschreiten. Der pH – Wert wurde überprüft und gegebenenfalls mit 0.5 M NaOH auf pH = 8.0 nachtitriert. Der Reaktionsansatz wurde zwei Stunden bei 35 °C inkubiert und anschließend an eine mit $TD_{8.0}$-Puffer äquilibrierte DEAE-Zellulose gebunden (Pasteurpipette: ∅ = 0.5 cm; Länge ≈ 1 cm DEAE/0.054µmol (10 ODml)). Es wurde solange mit 90 mM NaCl in $TD_{8.0}$-Puffer gespült, bis im Eluat zwischen 300 und 900 nm eine Absorption $OD_{max} < 0.03$ zu finden war. Dann eluierte man die modifizierte Antenne mit 300 mM NaCl in $TD_{8.0}$-Puffer. Diese Aufreinigung wurde so oft wiederholt, bis in der eluierten Antenne absorptionsspektroskopisch kein freies Pigment mehr zu erkennen war. Die modifizierte Antenne konnte bei –20 °C gelagert werden.

2.1.4 Pigmentextraktionen und -synthesen

Die Pigmentsynthesen wurden von Frau I. Simonin, Frau Dipl. chem. H. Snigula, Frau B. Wilhelm, Frau B. Strohmann und Herrn Dr. L. Fiedor durchgeführt.

Bakteriochlorophyll a (BChl) wurde aus *Rb. sphaeroides* R26 (von Frau C. Bubenzer-Hange gezogen) mit Methanol extrahiert und säulenchromatographisch über DEAE-Zellulose mit Chloroform/Methanol als Laufmittel gereinigt [Struck 1991].

Bakteriopheophytin a (BPhe) konnte aus BChl, das in Eisessig gelöst wurde, hergestellt werden. Die Aufreinigung erfolgte über präparative Kieselgelplatten (20 x 20 cm) mit Toluol/Aceton als Laufmittel [Rosenbach-Belkin 1988].

Bakteriochlorophyllid a (BChlid) konnte enzymatisch mit Hilfe von Chlorophyllase aus BChl gewonnen werden. Die Aufreinigung erfolgte über CM-Sepharose CL 6B (Pharmacia) mit Aceton als Laufmittel [Fiedor et al. 1992].

13^2-Hydroxy-Bacteriochlorophyll a ([13^2-OH]-BChl) wurde von BChl ausgehend in Methanol durch Oxidation des BChl durch Luftsauerstoff hergestellt. Die Aufreinigung erfolgte über DEAE-Zellulose mit Chloroform/Methanol als Laufmittel [Scheer & Struck 1993].

Zur Gewinnung von Pyro-Bakteriochlorophyll a (pyro-BChl) wurde BChl in Pyridin unter Argon mindestens 12 Stunden unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Die Aufreinigung erfolgte über DEAE-Zellulose mit Chloroform/Methanol als Laufmittel [Struck 1991].

Die Darstellung von 3^1-Hydroxyethyl-Bakteriochlorophyll a ([3^1-OH]-BChl) erfolgte nach Ditson [Ditson et al. 1984]. Dazu wurde BChl in einer Stickstoffatmosphäre in Ethanol gelöst und mit Natriumborhydrid versetzt. Die Aufreinigung erfolgte säulen-chromatographisch über DEAE-Zellulose mit Chloroform/Methanol als Laufmittel.

3-Desacetyl-3-Vinyl-Bacteriochlorophyll a ([3-Vinyl]-BChl) wurde aus aufgereinigtem [3^1-OH]-BChl in Toluol durch Kochen unter Rückfluss gewonnen. Die Aufreinigung erfolgte über DEAE-Zellulose mit Chloroform/Methanol als Laufmittel [Scheer & Struck 1993].

Chlorophyll a (Chl a) wurde durch Extraktion mit Aceton aus dem Cyanobakterium *Spirulina geitleri* gewonnen. Die Aufreinigung (evtl. nach Dioxan-Fällung) erfolgte durch Säulenchromatographie mit DEAE-Sepharose CL 6B. Als Laufmittel diente Hexan, dem zur Elution 0 – 3 % 2-Propanol zugesetzt wurde [Omata & Murata 1983].

3- Desvinyl-3-acetyl-Chlorophyll a ([Acetyl]-Chl a) wurde aus BChl a durch Oxidation mit 2,3-Dichloro-5,6-dicyanochinon (DDQ; Merck) gewonnen [Smith & Calvin 1966]. Die Reinigung erfolgte über DEAE-Zellulose mit Toluol/Methanol/2-Propanol als Laufmittel.

[Zn]-BPhe wurde in AcOH durch zweistündiges Kochen unter Rückfluss bei 80 °C in Anwesenheit von $ZnCl_2$ und NaOAc hergestellt. Die Aufreinigung erfolgte über Kieselgel mit Toluol/Aceton [Hartwich 1994].

2.1.5 Reaktion der LH2 mit Natriumborhydrid

Der isolierte Antennenkomplex wurde mit einem $TD_{8.0}$-Puffer (**100** mM Tris/HCl pH = 8.0, 0.06 % DM) auf 5.4µM (OD = 1.0 cm^{-1}) eingestellt und solange 5 mg-weise $NaBH_4$ (Merck) zugegeben, bis die Q_y-Bande bei 800 nm vollständig verschwunden war. Der Ansatz wurde über Nacht gegen $TD_{8.0}$-Puffer (**20** mM Tris/HCl) dialysiert an eine mit $TD_{8.0}$-Puffer äquilibrierte Q-Sepharose-Säule (Pharmacia) gebunden (Pasteurpipette: ∅ = 0.5 cm; Länge ≈1 cm Q-Sepharose/0.054 µmol (10 ODml)). Es wurde solange mit 90 mM NaCl in $TD_{8.0}$-Puffer gespült bis zwischen 300 und 900 nm eine Absorption von $OD_{max} < 0.03$ cm^{-1} zu finden war. Anschließend eluierte man die modifizierte Antenne mit 300 mM NaCl in $TD_{8.0}$-Puffer. Diese säulenchromatographische Aufreinigung wurde wiederholt, bis in der eluierten Antenne kein freies Pigment mehr zu erkennen war. Die Lagerung erfolgte bei –20 °C.

2.2 Analytische Methoden

2.2.1 SDS-PAGE

Lösung	Trenngel [ml]	Sammelgel [ml]
Acrylamidlösung	2.67	0.3
Gelpuffer	2.67	0.78
Wasser	1.59	3.15
Glycerin	1.06 (1.33 g)	-
10 % Ammoniumperoxidisulfat (BioRad)	3.98×10^{-2}	0.05
TEMED (Serva)	9.95×10^{-3}	1.25×10^{-2}
Gesamtvolumen	≈8.0	≈4.3

Tabelle 2-11: Pipettierschema für Trenngel und Sammelgel

	Chemikalien	Masse/Volumen [g/l]	Konzentration [Mol/l]
Acrylamidlösung (49.5 % T; 3 % C)	Acrylamid (BioRad)	480.0	6.75
	N,N-Methylenbisacrylamid (BioRad)	15.0	0.1
Gelpuffer	Tris/HCl (pH = 8.48)	363.3	3.0
	SDS (BioRad)	3.0	0.01
Anodenpuffer	Tris/HCl (pH = 8.9)	24.22	0.2
Kathodenpuffer	Tris	12.11	0.1
	Tricin (Serva)	17.92	0.1
	SDS	1.0	3.0×10^{-3}
Probenpuffer	Glycerin (Roth)	100 ml	1.36
	β-Mercaptoethanol (Merck)	50 ml	0.72
	SDS	2.0	7.0×10^{-3}
	Tris/HCl (pH = 6.8)		6.25×10^{-2}
	Bromphenolblau (Merck)	0.1	1.5×10^{-4}
Färbelösung	Serva Blau R 250 (Serva)	3.6	
	Essigsäure	100 ml	1.65
	Methanol	290 ml	9.0
Entfärber	Essigsäure	70 ml	1.2
	Methanol	400 ml	12.5

Tabelle 2-12: Lösungen für SDS-PAGE; aufgefüllt wird mit destilliertem Wasser

Zur Anwendung kam die Polyacrylamid-Gelelektrophorese [Laemmli 1970] nach der Methode von Schägger und von Jagow [Schägger & Jagow 1987] für Minigele (80 mm x 70 mm x 0.75 mm, Miniprotean II®, BioRad). Die verwendeten Lösungen und das Pipettierschema sind tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 2-11 und Tabelle 2-12).

Die konzentrierten Antennenproben wurden mit mindestens der doppelten Menge Probenpuffer bis zu einer Konzentration von etwa 2.5 µg/10 µl αβ (OD = 7.5 cm^{-1}) verdünnt. Wenn nötig wurden die Proben vorher mit Hilfe von Macroseps (30 kDa Ausschlussgröße; Pall Filtron) aufkonzentriert. Zur vollständigen Denaturierung wurden die Komplexe für 15 Minuten bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden maximal 10 µl der aufkonzentrierten Probe in die Taschen des Sammelgels gefüllt. Bis zum Einlauf der Antennen in das Trenngel betrug die Spannung 30 V, für den Lauf durch das Trenngel betrug die Stromstärke 50 mA. Der Lauf wurde etwa 30 Minuten nachdem die Banden des Bromphenolblau aus dem Gel gelaufen waren abgebrochen. Die Banden der Proteine ließen sich entweder durch Silberfärbung [Ansorge 1985] oder durch zweistündige Färbung mit Coomassieblau (Tabelle 2-12) [Laemmli 1970] und anschließende Entfärbung des Gels sichtbar machen.

Die Molmassen der nachgewiesenen Banden ergaben sich aus einem Vergleich mit einem Molekulargewichtsmarker (Serva; Trypsin Inhibitor (bovine) M_r = 6.5 kDa; Cytochrom c M_r =

12.5 kDa; Trypsin Inhibitor (Soja) M_r = 21 kDa; Carboanhydrase M_r = 29 kDa).

Zur Aufbewahrung wurden die Gele über Nacht in Wasser, dem 20 % Glycerin beigemischt war, geschüttelt und auf einem Geltrockner (Hoefer Scientific Instruments drygeljr.) 30 Minuten getrocknet.

2.2.2 Pigmentanalyse über HPLC

Die Extraktion der Pigmente für die HPLC-Analyse erfolgte über eine kleine DEAE-Zellulose-Säule (Pasteurpipette ∅ = 0.5 cm; Länge ≈ 1 cm DEAE). Die Antennenlösung wurde so verdünnt, dass die Salzkonzentration 80 mM nicht überstieg. Die adsorbierten LH2 wurden mit 10 ml Wasser gewaschen, um Puffer und Detergens vollständig zu entfernen. Das Wasser wurde dann durch kurzzeitiges Beblasen mit Argon vorsichtig beseitigt. Anschließend eluierte man die Pigmente mit je 1 ml Methanol und Aceton (dabei werden die ersten, noch nicht grünen, aber stark wasserhaltigen Tropfen verworfen). Der Pigmentextrakt wurde im Argonstrom eingetrocknet, und die Pigmente für die unmittelbar folgende HPLC-Analyse in wenig Toluol aufgenommen.

Für die Trennung von unterschiedlichen BChl- und Chl-Derivaten wurde eine Kieselgelsäule (Econosphere Silica 5 µ) und ein nichtlinearer Laufmittelgradient (Tabelle 2-13) [Bandilla, 1995] bestehend aus Toluol, 2-Propanol und Methanol (s.u.) verwendet. Die Trennung erfolgte unter Kühlung der Säule bei 4 °C und einer Flussrate von 2.5 ml/min mit einer programmierbaren HPLC-Anlage der Firma Abimed, bestehend aus 2 Pumpen (305/306, Dynamic Mixer 811B, Manometric Module 805 und 7125) und Injektor (Rheodyne) mit einem Injektionsvolumen von 50 µl.

Als Detektor diente ein HP 8451 A Diodenarray-Photometer (Hewlett-Packard) mit einer 30 µl-Durchflussküvette, der die Einzelspektren von 300 bis 818 nm alle 3 s aufnahm. Die Daten wurden mit selbst geschriebenen Programmen (HPLC1 H und 3D Plott von Dr. A. Pazur, 1992, 1993) ausgewertet.

Es wurden folgende Laufmittel benutzt:

Laufmittel A:	99.9 %	Toluol	0.05 %	2-Propanol	0.05 % Methanol
Laufmittel B:	86.75 %	Toluol	1.25 %	2-Propanol	12 % Methanol

Zeit [min]	% A	% B
0	100	0
2	100	0
8	80	20
9	70	30
10	50	50
13	0	100
17	0	100
20	100	0

Tabelle 2-13: Gradientenverlauf (die Übergänge verlaufen linear)

Zur quantitativen Auswertung wurden die Peakflächen für die Spur des jeweiligen Soretmaximums bestimmt und dann die Pigmentmenge mit Hilfe der Extinktionskoeffizienten berechnet. Zu deren Bestimmung wurde eine kleine Menge Pigment nacheinander in Ether bzw. im Laufmittel gelöst, jeweils ein Spektrum gemessen und dann aus den Absorptionen, den Lösungsmittelvolumina und dem bekannten Extinktionskoeffizienten in Ether der Koeffizient für das Laufmittel berechnet. Für jedes Pigment wurde diese Messung fünfmal durchgeführt und der Mittelwert bestimmt.

2.3 Spektroskopische Methoden

Alle Spektren wurden, soweit nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur aufgenommen. Die Daten wurden mit einem von Dr. A. Pazur geschriebenen Programm ins ASCII - Format konvertiert, und mit Origin 4.0 (MicroCal) bzw. Excel 97 (Microsoft) ausgewertet.

2.3.1 Absorption

Die Absorptionsspektren wurden mit einem Lambda 2 Spektralphotometer (Perkin Elmer) mit firmeneigener Software (PECSS, Vers. 3.2) gemessen.

2.3.2 Circulardichroismus

Die CD-Spektren wurden mit einem Dichrograph CD 6 (Yobin Yvon) mit firmeneigener Software (Dichrograph Software, Vers. 1.1) aufgenommen. Zur Detektion wurde ein rotempfindlicher Photomultiplier R316 (300-1000 nm; Hamamatsu) verwendet. Die maximale Konzentration betrug 4.3 µM (OD = 0.8 cm^{-1}), um nichtlineare Effekte zu vermeiden.

2.3.3 Fluoreszenz

Zur Messung der Fluoreszenzspektren diente ein Spex Fluorolog 221 Fluorimeter (Yobin-Yvon) mit selbstgeschriebener Messsoftware (Dr. A. Pazur). Die Detektion erfolgte mit einem rotempfindlichen Photomultiplier R316 (300-1000 nm; Hamamatsu), der zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses mit einen Peltier-Kühler (PMT-Cooler PKN-TC51) auf –30 °C gekühlt wurde. Die gezeigten Spektren sind nicht korrigiert. Die maximale Konzentration der Proben betrug jeweils 0.54 µM (OD = 0.1cm^{-1}), um eine Reabsorption des Fluoreszenzlichts zu vermeiden.

3 CHARAKTERISIERUNG VON LH2

3.1 Einführung

Die Versuche wurden an den peripheren Lichtsammlerkomplexen (LH2) aus *Rhodobacter (Rb.) sphaeroides,* aus zwei unterschiedlichen Stämmen von *Rhodo-pseudomonas (Rps.) acidophila* und aus *Rhodospirillum (Rs.) molischianum* durch-geführt. Diese Arten aus der Familie der Rhodospirillaceae wurden für die spektralen Untersuchungen des LH2-Komplexes verwendet, da für LH2 aus *Rps. acidophila 10050* und *Rs. molischianum* hochaufgelöste Kristallstrukturen vorhanden sind [McDermott et al. 1995, Koepke et al. 1996]. Für das LH2 aus *Rb. sphaeroides* liegen gute biochemische [Zuber & Cogdell 1995; Olsen & Hunter 1994] und spektroskopische [van Grondelle et al. 1994] Daten vor, die somit die Grundlage für die Interpretation der spektroskopischen und biochemischen Eigenschaften der anderen Antennen stellen. In diese Untersuchungen wurde zusätzlich die nur im Schwachlicht und bei niedrigen Temperaturen gebildete B800-820-Antenne aus *Rps. acidophila* 7750 [Gardiner et al. 1993] eingebunden. Dadurch wird ein Vergleich des B800-820-Komplexes mit B800-850-Komplexen möglich. Von der Schwachlicht-Modifikation des B800-B820-Komplexes aus *Rps. acidophila* 7050 existiert mittlerweile auch eine Kristallstruktur [Mc Luskey et al. 2001].

3.2 Isolierung der peripheren Antennen

Die peripheren Antennen aus *Rps. acidophila* 10050 und 7750, *Rs. molischianum* und *Rb. sphaeroides* wurden nach einer modifizierten Methode von Bandilla [Bandilla et al. 1998] isoliert. Die Bakterien wurden in eigenen Laborkulturen (Kapitel 2.1.1) gezogen und geerntet. Nach dem Aufbrechen der Zellen mit Hilfe einer French Press und nach dem Abzentrifugieren der übriggebliebenen ganzen Zellen und der großen Zellbruch-stücke wurden die Chromatophoren mittels Ultrazentrifugation pelletiert. Die isolierten Chromatophore wurden mit LDAO solubilisiert. Dabei wurden der Hauptteil der Kern-antenne denaturiert und der verbliebene Kernkomplex durch einen anschließenden Saccharosegradienten entfernt. Die so gewonnenen LH2-Fraktionen wurden anschließend säulenchromatographisch über DEAE-Zellulose vollständig aufgereinigt.

3.3 Spektrale und chromatographische Eigenschaften der LH2

Die so hergestellten peripheren Lichtsammlerkomplexe wurden bezüglich ihrer spektralen Eigenschaften wie Absorption, CD, Fluoreszenz und ihrer Pigment- und Proteinzusammensetzung mit Hilfe von HPLC und SDS-Page untersucht.

3.3.1 Absorption

Die Absorptionsspektren der isolierten peripheren Antennen aus *Rps. acidophila* 7750, *Rps. acidophila* 10050, *Rs. molischianum und Rb. sphaeroides* (Bild 3-1; Tabelle 3-1) spiegeln, abgesehen von der Proteinbande (ca. 280 nm), die Absorptionseigenschaften der gebundenen Pigmente wieder (s. Kapitel 1.5). So findet man zwischen 300 und 400 nm die Soret-Banden, bei etwa 590 nm die Q_x-Bande und zwischen 795 und 860 nm die Q_y-Banden des BChls. Die Carotinoid-Banden befinden sich zwischen 440 und 530 nm.

Die Absorptionsspektren der vier ausgewählten B800-850-Komplexe zeigen keine signifikanten Unterschiede im Protein-, Soret-, Carotinoid- und Q_x-Bereich. Deutliche Änderungen sind aber in der Region zwischen 795 und 860 nm der Q_y-Bande auszumachen. So zeigt *Rs. molischianum* in diesem Bereich eine vergleichbare Banden-lage (847 nm) wie *Rb. sphaeroides* (848 nm). Aber *Rps. acidophila* 7750 produziert unter Schwachlicht-Bedingungen bei 20 °C einen Komplex, bei dem sich die Q_y-Bande um etwa 30 nm von etwa 848 nm nach 817 nm blau verschiebt, und der LH2-Komplex aus *Rps. acidophila* 10050 ist in dieser Region um 10 nm rotverschoben.

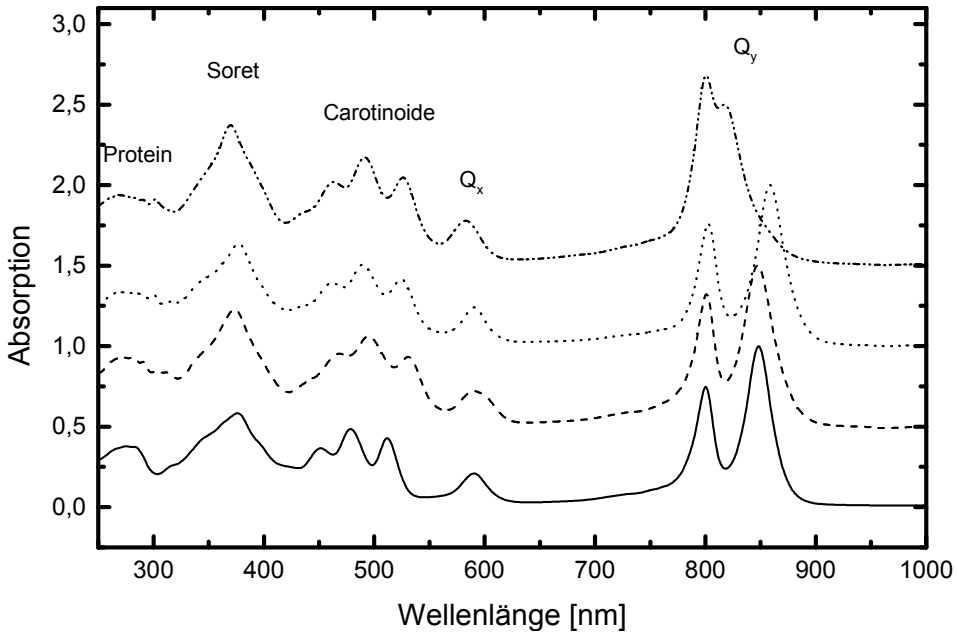


Bild 3-1: Absorptionsspektren der isolierten peripheren Lichtsammlerkomplexe aus *Rps. acidophila* 7750 (- • • -), *Rps. acidophila* 10050 (• • •), *Rs. molischianum* (- - -) und *Rb. sphaeroides* (—) in TL-Puffer. Die Spektren wurde auf $\lambda_{max} = 1\ cm^{-1}$ normiert

Bakterienart	**Wellenlängen [nm]**				
	Soret	**Carotinoide**	**Q_x**	**Q_y(B800)**	**Q_y (B850)**
***Rps. acidophila* 7750**	370	463/491/526	583	801	817
***Rps. acidophila* 10050**	377	461/490/524	590	802	858
Rs. molischianum	374	468/495/531	594	801	847
Rb. sphaeroides	375	450/478/511	589	798	848

Tabelle 3-1: Charakteristische Absorptionsbanden der isolierten LH2-Komplexen aus *Rps. acidophila* 7750, *Rps. acidophila* 10050, *Rs. molischianum und Rb. sphaeroides*.

3.3.2 Circulardichroismus

Das CD-Spektrum reagiert sensibler als das Absorptionsspektrum auf die Orientierung der Pigmente und auf Wechselwirkungen sowohl der Pigmente untereinander, als auch von Pigmenten und Proteinen.

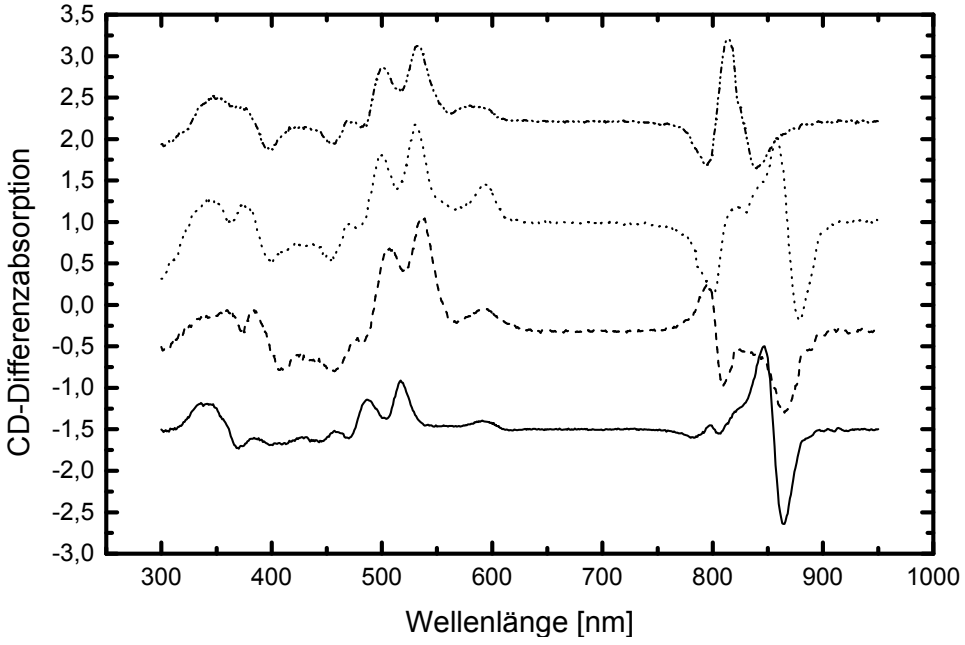


Bild 3-2: CD-Spektren der isolierten peripheren Lichtsammlerkomplexen von oben nach unten, aus *Rps. acidophila* 7750 (- • • -), *Rps. acidophila* 10050 (• • •), *Rs. molischianum* (- - -), *Rb. sphaeroides* (—).

Bakterienart	Wellenlängen [nm]				
	Soret	**Carotinoide**	**Q_x**	**Q_y(B800)**	**Q_y(B850)**
***Rps. acidophila* 7750**	352(+)/374(+) 398(-)	456(-)/483(-) 501(+)/533(+)	583(+)	792(-)	814(+)/828 (0)/841(-)
***Rps. acidophila* 10050**	344(+)/378(+) 401(-)/365(-) 432(+)	456(-) 471(+)/480(-) 500(+)/532(+)	595(+)	802(-)	858(+)/869 (0)/880(-)
Rs. molischianum	362(+)/375(-) 384(+)/409(-)	457(-)/508(+)/538(+)	590(+)	796(+) 803(0) 810(-)	867(-)
Rb. sphaeroides	342(+)/370(-) 385(+)/404(-)	429(+)/458(+)/471(-) 488(+)/519(+)	592(+)	782(-) 797(+) 806(-)	847(+)/855 (0)/865(-)

Tabelle 3-2: Charakteristische CD-Banden der isolierten LH2-Komplexe aus *Rps. acidophila* 7750, *Rps. acidophila* 10050, *Rs. molischianum*, *Rb. sphaeroides*. (+): CD-Maxima, (-) Minima, (0): Schnittpunkt mit der Nulllinie

Das CD-Spektrum (Bild 3-2; Tabelle 3-2) des isolierten B800-B850-Komplexes von *Rb. sphaeroides* weist im Q_y-Bereich zwei konservative, sigmoidale Doppelbanden auf. Die eine Doppelbande ist schwach ausgebildet und überlagert eine breite negative Bande bei etwa 782 nm. Ihr Maximum findet sich bei 797 nm und ihr Minimum bei 806 nm. Die zweite Doppelbande ist sehr intensiv und zeigt eine positive Bande mit einem Maximum bei 847 nm und eine negative Bande mit einem Minimum bei 865 nm. Der Schnittpunkt mit der Nulllinie bei 855 nm ist um 7 nm bezüglich des Maximums des Absorptionsspektrums rotverschoben. Die Q_x-Bande ist positiv und im Vergleich zur Absorption um 3 nm ins Rote verschoben. Im Bereich der Soret-Bande findet man zwischen 342 und 404 nm ein Muster aus sich überlagernden positiven und negativen Banden. Auch die Carotinoide weisen eine solche Anordnung von intensiven sich überlagernden positiven Banden bei 429, 458, 488 und 519 nm und einer negativen bei 471 nm auf. Sowohl die Lage der Extrema der Soret-Banden, als auch die der Carotinoide stimmen nicht mit den Maxima der Absorptionsspektren überein, was auf excitonische Kopplungen zurückzuführen ist.

Die CD-Spektren der beiden Lichtsammler-Komplexe aus *Rps. acidophila* (Bild 3-2 und Tabelle 3-2) weisen ähnliche Muster und analoge Lagen der Banden im Vergleich zu den jeweiligen Absorptionsspektren auf wie sie auch schon bei *Rb. sphaeroides* zu beobachten waren. So finden sich auch hier intensive sich überlagernde positive und negative Banden im

Bereich der Carotinoide und in der Soret-Region, die nicht mit den Maxima des jeweiligen Absorptionsspektrums übereinstimmen. Die positiven Q_x-Bande ist bei *Rps. acidophila* 10050 um 5 nm auf 595 nm rotverschoben, während sich die Lage der Q_x-Bande bei 583 nm von *Rps. acidophila* 7750 nicht verändert. Auch bei den beiden Antennen aus *Rps. acidophila* gibt es intensive sigmoidal konservative Doppel-banden im Bereich der Q_y-Bande. Sie zeigen eine positive Bande mit einem Maximum von 858 nm bei *Rps. acidophila* 10050 bzw. 814 nm bei *Rps. acidophila* 7750 und einer negativen Bande mit einem Minimum von 880 nm bei *Rps. acidophila* 10050, bzw. 841 nm bei *Rps. acidophila* 7750. Der Schnittpunkt mit der Nulllinie liegt bei 869 nm bei *Rps. acidophila* 10050 bzw. 828 nm bei *Rps. acidophila* 7750 und ist somit um 11 nm bezüglich der Maxima des jeweiligen Absorptionsspektrums rotverschoben. Einziger Unterschied zum CD-Spektrum des LH2-Komplexes aus *Rb. sphaeroides* liegt im Bereich des BChl-B800. Dort sind statt der schwachen sigmoidalen Doppelbande lediglich breite negative Banden von 802 nm bei *Rps. acidophila* 10050 und 792 nm bei *Rps. acidophila* 7750 zu sehen.

Auch das CD-Spektrum des B800-850-Komplexes aus *Rs. molischianum* zeigt weitgehend ähnliche Muster und analoge Lagen der Banden im Vergleich zum Absorptionsspektrum, wie sie auch schon bei *Rb. sphaeroides* zu beobachten waren. So findet man im Bereich der Soret-Bande zwischen 362 und 409 nm ein Muster aus sich überlagernden positiven und negativen Banden. Auch die Carotinoide weisen eine solche Anordnung von intensiven sich überlagernden positiven Banden bei 426, 508 und 538 nm, und einer negativen Bande bei 457 nm auf. Auch hier ist die Lage der Extrema sowohl der Soret-Banden, als auch die der Carotinoide nicht mit den Maxima des Absorptionsspektrums identisch. Die Q_x-Bande ist positiv und weist, genau wie in den LH2-Komplexen aus *Rps. acidophila,* im Vergleich zur Absorption eine unveränderte Bandenlage auf. Der große Unterschied zu den vorher besprochenen Antennen ist im Bereich der Q_y-Banden zwischen 790 und 810 nm zu finden. So zeigt der LH2-Komplex aus *Rs. molischianum* eine intensive konservative, sigmoidale Doppelbande im Bereich von 800 nm mit einer positiven Bande bei 796 nm und einer negativen bei 810 nm. Der Schnittpunkt mit der Nulllinie befindet sich bei 803 nm und ist damit um 2 nm bezüglich des Absorptionsmaximums rotverschoben. Im Bereich des BChl-850 findet sich dagegen lediglich ein negatives Signal bei 867 nm.

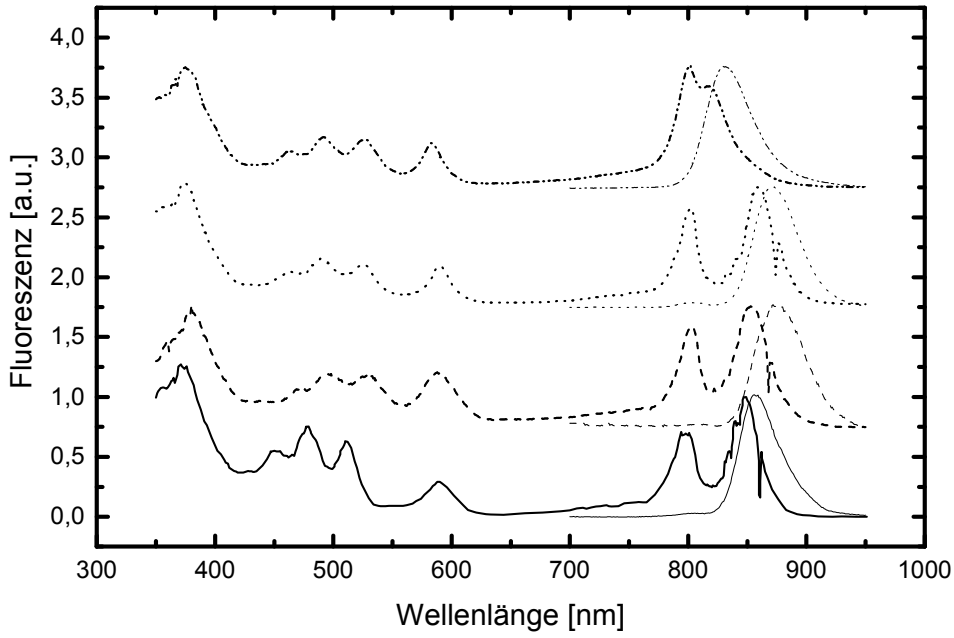
3.3.3 Fluoreszenz

Die Fluoreszenz-Anregungsspektren der BChl-B850 bzw. BChl-B820 geben alle Banden der jeweiligen Absorptionsspektren wieder. Dies belegt einen Energietransfer mit hohen Quantenausbeuten von den Carotinoiden und den BChl-B800 auf die BChl-B850 bzw. BChl-

B820. Insbesondere ist der Energietransfer in den Fluoreszenz-Anregungsspektren, nach Detektion in der jeweils langwelligsten Emissionsbande, anhand des Auftretens von Carotinoid-Banden erkennbar. Dieser Energietransfer zwischen den Carotinoiden und den BChl-B800 / B850 bzw. BChl-B800 / B820 ist das wichtigste Merkmal, über das die Antennen eindeutig von freien Pigmenten unterscheidbar sind.

Zusätzlich wurden Fluoreszenz-Emissionsspektren zwischen 700 und 950 nm aufgenommen, nachdem sie bei der jeweils langwelligsten Carotinoid-Bande angeregt wurden (Bild 3-3 und Tabelle 3-3). Alle Antennen zeigen ein dominantes Emissions-maximum. Die Lage der Maxima entspricht denen der BChl-B850-Absorptionen mit einer Rotverschiebung (Stokes-Verschiebung) zwischen 10 und 30 nm (Tabelle 3-3), wobei auch hier das Emissionsmaximum von *Rs. molischianum* einen ausgeprägteren Stokes-Shift (31 nm) aufweist als die anderen Antennen(10 – 16 nm).

In dem Emissionsspektrum der B800-850 Antennen aus *Rb. sphaeroides* findet man zusätzlich eine zweite Emissionsbande bei etwa 805 nm, die in etwa eine Intensität von 2 % der Hauptemission aufweist. Dieses Phänomen findet man auch bei den B800-850-Lichtsammlerkomplexen aus *Rps. acidophila* 10050 und in geringerem Ausmaß bei *Rs. molischianum*. Bei der Emission des B800-820-Komplexes aus *Rps. acidophila* 7750 liegt diese Bande wohl unter der Emissionsbande der B820 verborgen. Da diese Bande gegenüber der Emissionsbande freier Pigmente um ca. 10 nm rotverschoben ist und vor allem auch nach Anregung in den Carotinoid-Banden (Bild 3-3; Tabelle 3-3) auftritt, ist sie dem BChl-B800 der Antenne zuzuordnen. Es zeigt, dass die Effektivität des Energietransfers von dem BChl-B800 auf die BChl-B850 sehr hoch ist.



dicke Linie: Excitationsspektren
dünne Linie: Emissionsspektren

Bild 3-3: Fluoreszenzanregungs- und Emissionsspektren der isolierten peripheren Lichtsammlerkomplexe aus:
Rps. acidophila 7750 (- • • -); (λ_{Em} = 833 nm; λ_{Ex} = 526 nm),
Rps. acidophila 10050 (• • •); (λ_{Em} = 875 nm; λ_{Ex} = 524 nm),
Rs. molischianum (- - -); (λ_{Em} = 878 nm; λ_{Ex} = 531 nm),
Rb. sphaeroides (—); (λ_{Em} = 858 nm; λ_{Ex} = 511 nm).

Bakterienart	**Emission [nm]**	**angeregt bei [nm]**	**Stokes-Shift [nm]**
***Rps. acidophila* 7750**	833	526	16
***Rps. acidophila* 10050**	875	524	17
Rs. molischianum	878	531	31
Rb. sphaeroides	858	511	10

Tabelle 3-3: Charakteristische Fluoreszenzemissionsbanden der isolierten LH2-Komplexen aus *Rps. acidophila* 7750, *Rps. acidophila* 10050, *Rs. molischianum* und *Rb. sphaeroides.*

3.3.4 Proteinzusammensetzung

Da die bisher verwendeten spektroskopischen Methoden wie Absorptions-, CD- und Fluoreszenzspektroskopie nicht dazu geeignet sind, kleine Mengen an Proteinverunreinigungen zu detektieren (Kapitel 3.3.1 bis 3.3.3), wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit Comassie-Färbung zur routinemäßigen Reinheitskontrolle verwendet (Bild 3-4).

Wie bereits in der Einleitung (Kapitel 1.3) erwähnt, sind in den peripheren Lichtsammlerkomplexen die Licht absorbierenden Pigmente nicht-kovalent an zwei niedermolekulare Apoproteine α und β gebunden [Zuber & Cogdell 1995]. Diese beiden Untereinheiten finden sich auch in dem in Bild 3-4 dargestellten Gel bei den B800-850-Komplexen aus *Rb. sphaeroides, Rps. acidophila* 10050 und *Rs. molischianum* wieder. Lediglich der B800-820-Komplex aus *Rps. acidophila* 7750 besitzt drei Apoproteine, die auch schon durch Zuber und Brunisholz [Zuber & Brunisholz 1991] nachgewiesen wurden. Das Molekulargewicht, das man mittels SDS-PAGE findet, ist nicht äquivalent mit der tatsächlichen Molmasse, die bei einer Sequenzierung gewonnen wird [Zuber & Brunisholz 1991], da sie im Gegensatz zu den entsprechenden hydrophilen Proteinen eine unterschiedliche Mengen an SDS binden. Zum anderen entfalten sie sich nicht immer vollständig.

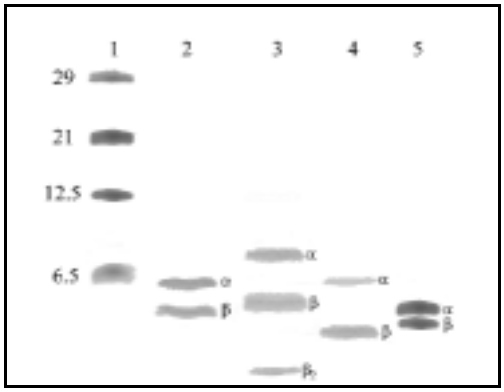


Bild 3-4: SDS-PAGE der B800-850 bzw. B800-820 α und β–Polypeptide aus *Rps. acidophila* 7750, *Rps. acidophila* 10050, *Rs. molischianum, Rb. sphaeroides*. 1: Proteinmarker in kDa; 2: *Rb. sphaeroides*; 3: *Rps. acidophila* 7750; 4: *Rps. acidophila* 10050; 5: *Rs. molischianum.*

	Polypeptide	scheinbares Molekulargewicht SDS-PAGE [kDa]	Molekulargewicht AS-Sequenzierung [kDa]
***Rps. acidophila* 7750**	B800-820-α	8	5.567[1]
	B800-820-β_1	5	4.721[1]
	B800-820-β_2	1	4.52[1]
***Rps. acidophila* 10050**	B800-850-α	6	5.654[1]
	B800-850-β	3	4.554[1]
Rs. molischianum	B800-850-α	4.5	5.939[2]
	B800-850-β	3.5	5.133[2]
Rb. sphaeroides	B800-850-α	6	5.647[1]
	B800-850-β	4.5	5.85[1]

Tabelle 3-4: Scheinbare (SDS-PAGE) und durch Aminosäure-Sequenzierung bestimmte Molekulargewichte der Apoproteine α und β.
[1)] [Zuber & Brunisholz 1991]; [2)] [Germeroth et. al. 1993]

3.3.5 Pigmentzusammensetzung

Zur Kontrolle, ob die nachfolgenden Versuche wie die Rekonstitution modifizierter Pigmente Erfolg hatten, ist es wichtig, die genaue Pigmentzusammensetzung zu kennen. Die zuverlässigsten Daten liefert hierfür die Pigmentanalyse mittels DAD-HPLC. Diese Methode vermeidet, im Gegensatz zur Bestimmung im Absorptionsspektrum, Fehler, die durch Überlagerungen verschiedener Pigmentabsorptionen entstehen können. Es lassen sich damit auch geringe Mengen Pigment feststellen und quantifizieren. Fehler-quellen können in der unzureichenden Extraktion der Pigmente, deren unvollständiger Lösung im Lösungsmittel, sowie in der Degradation der Pigmente begründet liegen (Kapitel 2.2.2).

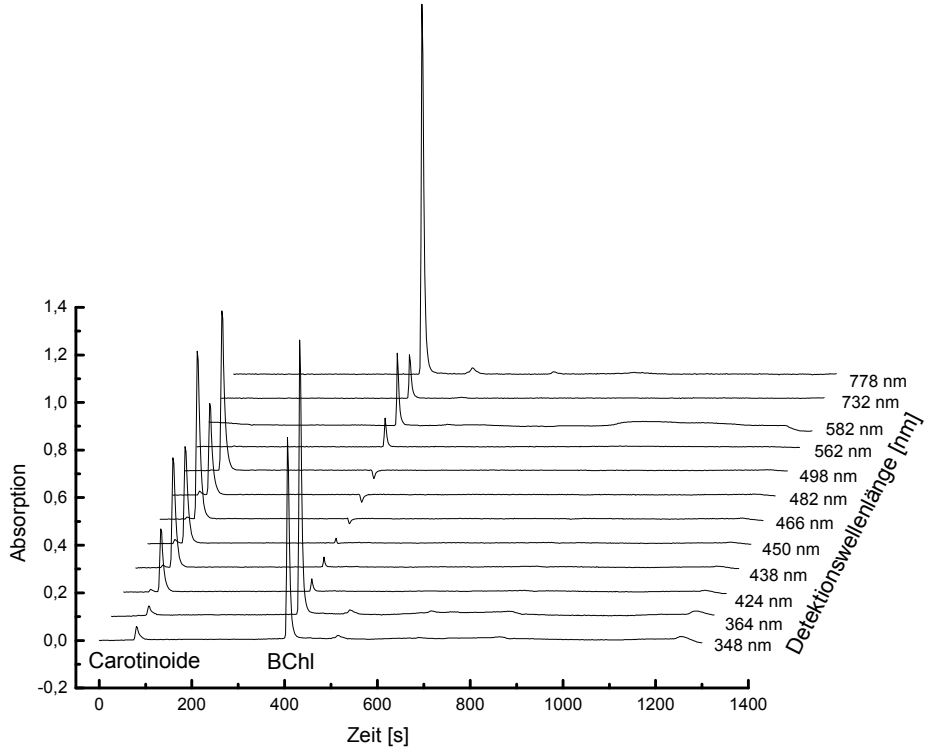


Bild 3-5: HPLC-Analyse eines MeOH-Extraktes des LH2-Komplexes aus *Rb. sphaeroides.*

Bakterienart	**Retentionszeiten**		**∑∫Car : ∫BChl**
	Carotinoide [s]	**BChl [s]**	
***Rps. acidophila* 7750**	56 / 174 / 734	404	1 : 1.97
***Rps. acidophila* 10050**	56 / 180 / 734	402	1 : 2.04
Rs. molischianum	58 / 224 / 742	402	1 : 1.63
Rb. sphaeroides	80	406	1 : 1.59

Tabelle 3-5: Retentionszeiten (Sekunden) der isolierten Pigmente der LH2-Komplexe und die jeweiligen Verhältnisse der Summen der Integrale der Carotinoide zu dem Integral über BChl.

In Bild 3-5 sieht man exemplarisch das HPLC-Spektrum eines MeOH-Extraktes des LH2-Komplexes aus *Rb. sphaeroides.* Das Carotinoid (in einer aeroben gezogenen Kultur hauptsächlich Spheroidenon) eluierte nach ca. 80 s, das BChl nach etwa 406 s. Da die exakten Extinktionskoeffizienten im Laufmittelgemisch nicht bestimmt wurden, konnte nur eine relative Quantifizierung vorgenommen werden. Zur Bestimmung des Carotinoid-BChl-Verhältnisses wurde das Chromatogramm des jeweiligen Pigments über die entsprechende Retentionszeit integriert. Dazu wurde das Integral über BChl ins Verhältnis zur Summe der Integrale über die Carotinoide gesetzt. Dabei wurde die Summe der Integrale über die Carotinoide gleich 1 gesetzt. Demzufolge beträgt das Verhältnis der Integrale aller Carotinoide zum Integral des BChl 1 zu 1.59 (Tabelle 3-5) (Diese Werte sind Durchschnittswerte, sie wurden durch jeweils drei analoge Ansätze bestimmt.). Dieses relative Verhältnis konnte nicht in ein molares Verhältnis umgerechnet werden, da die exakten Extinktionskoeffizienten in dem verwendeten Laufmittelgemisch nicht bekannt sind. Auch bei *Rs. molischianum* liegt das Verhältnis bei 1 zu 1.6, bei den Komplexen aus *Rps. acidophila* liegt das Verhältnis bei etwa 1 zu 2. Diese Daten wurden als Grundlage zur Bestimmung des BChl-Carotinoide-Verhältnisses bei den Rekonstitutionsversuchen verwendet (Kapitel 5 und 6).

Die Auftrennung von BChl und BChl' ist mit diesem System nicht möglich. Bei verunreinigten Proben findet man zudem Banden nach etwa 370 s, die vom BPhe a stammen, und bei etwa 490 s eine Bande vom [13^2-OH]-BChl. Beides sind Degradationsprodukte des BChl.

3.4 Diskussion

Die Absorptions-, CD- und Fluoreszenzeigenschaften der isolierten Komplexe aus *Rb. sphaeroides* [Bandilla 1995], den beiden *Rps. acidophila*-Stämmen [Cogdell & Scheer 1985; Fraser et. al. 1999] und *Rs. molischianum* [Germeroth et al. 1993] sind identisch mit den jeweiligen in der Literatur beschriebenen. Aufgrund dieser Kriterien sind die in dieser Arbeit verwendeten Lichtsammler-Komplexe analog zu den in der Literatur beschriebenen.

Betrachtet man die Absorptionsspektren (Bild 3-1 und Tabelle 3-1) der isolierten Antennen, sind bemerkenswerte Unterschiede in den Q_y-Bereichen des jeweiligen BChl-B850 festzustellen. So besitzt der LH2-Komplex aus *Rps. acidophila* 7750 ein Maximum bei 817 nm, der aus *Rps. acidophila* 10050 eines bei 858 nm, der aus *Rs. molischianum* eines bei 847 nm und der aus *Rb. sphaeroides* eines bei 848 nm. Diese spektralen Verschiebungen können durch verschiedene Faktoren, wie excitonisch gekoppelte Aggregate [Kasha et al. 1965; Pearlstein 1991], eine Deformation in der Struktur der Makrozyklen [Barkigia & Fajer 1993], Ladungen in der lokalen Umgebung der Chromatophore [Eccles & Honig 1983], oder

Wasserstoff-Brückenbindungen der C-3-Acetyl-und der C-13[1]-Keto-Gruppe [Hanson 1991], sowie eine Entkopplung der konjugierten Seitenketten durch Rotation [Gudowska-Nowak et al. 1990] hervorgerufen werden. Bei den beiden Antennen aus *Rps. acidophila* wird die Verschiebung vor allem auf die in den Röntgenstrukturen gefundenen Rotation der C-3-Acetyl-Gruppe relativ zum π-gekoppelten System der Makrozyklen zurückgeführt [Mc Luskey et al. 2001; Gudowska-Nowak et al. 1990], d.h. es findet eine Entkopplung der konjugierten Seiten-ketten durch die Rotation der Acetyl-Gruppe statt.

Im CD-Spektrum (Bild 3-2; Tabelle 3-2) der isolierten B800-850- bzw. B800-820- Komplexe findet man im Bereich der Carotinoide (Bereich zwischen 450 –550 nm) Muster aus sich überlagernden positiven und negativen intensiven Banden, deren Maxima und Minima nicht mit denen der Absorptionsspektren übereinstimmen. Dies deutet auf eine excitonische Wechselwirkung der Carotinoide mit den BChl oder den Proteinen hin [Kingma et al. 1985], wie sie erstmals an einen Peridinin-Chlorophyll- Komplex bewiesen werden konnte [Hofmann et al. 1996]. Es könnte sich auch um eine excitonische Kopplung der Carotinoide untereinander handeln, wie sie auch beim PCP diskutiert wird. Da aber in der Röntgenstruktur bisher nur ein Carotinoid aufgelöst ist, kann diese Frage bisher nicht zufriedenstellend beantwortet werden. Der Q_y-Bereich des BChl-B850 zwischen 810 und 870 nm bei den Antennen aus *Rps. acidophila* und *Rb. sphaeroides* zeigt im CD-Spektrum intensive, sigmoidale Doppelbanden, die auf excitonisch gekoppelte Pigmente zurückzuführen sind [Scherz & Parson 1984 und 1986; Cogdell & Scheer 1985; Scherz & Rosenbach-Belkin 1989; Sauer et al. 1996; Koolhaas et al. 1997; Alden et al. 1997]. Konservative Doppelbanden finden sich aber auch im Bereich des „monomeren“ BChl-B800 bei *Rb. sphaeroides* und *Rs. molischianum*, die bereits von Bandilla [Bandilla et al. 1998] und Visschers [Visschers et al. 1995] beobachtet wurden. Sie belegen, dass entweder die BChl-B800 schwache excitonische Kopplung besitzen können [Cogdell & Scheer 1985], oder es sich auch um die höheren Zustände des BChl-B850 handeln könnte. Diese Frage sollte sich aber durch Extraktion des BChl-B800 klären lassen.

Bemerkenswert ist darüber hinaus das CD-Signal von *Rs. molischianum* im Bereich des Q_y-Übergangs. Die Antennen der Komplexe aus *Rps. acidophila* weisen in diesem Bereich ein negatives Signal im Bereich der BChl-B800 auf und eine sigmoidale Doppelbande im Bereich der BChl-B850. Bei *Rs. molischianum* ist es genau umgekehrt, d.h. es hat eine sigmoidale Doppelbande im Bereich der BChl-B800 und eine negative Bande im Bereich der BChl-B850. Das Spektrum von *Rb. sphaeroides* ist eine Zwischenstufe zwischen beiden. Überraschenderweise unterscheiden sich die Kristall-strukturen der peripheren Lichtsammelkomplexe aus *Rps. acidophila* 10050 [McDermott et al. 1995] und die der Antenne des *Rs. molischianum* [Koepke et al. 1996] hauptsächlich in der geometrischen Anordnung des „monomeren“ BChl-B800 und nicht in der des aggregierten BChl-B850,

während die Unterschiede der CD-Spektren gerade im Bereich der aggregierten BChl-B850 liegen. Basierend auf biochemischen und Sequenzstudien konnte gezeigt werden, dass der LH2-Komplex aus *Rs. molischianum* mehr Ähnlichkeiten mit einer LH1-Antenne aufweist, als mit anderen peripheren Lichtsammlerkomplexen verschiedener Purpurbakterien [Gemeroth et al 1993]. Dies wird auch durch die Analyse von Tieftemperaturspektren verifiziert [Visschers et al. 1995]. Resonanz-Raman-Studien wurden so interpretiert, dass die zwei wichtigsten Aminosäuren, die Wasserstoff-Brückenbindungen zum BChl bilden, das α-Trp 45 und das β-Trp 44 sind. Diese befinden sich innerhalb des Wasserstoff-Brückenbindung-Abstands vom 3-Acetyl-Sauerstoffs der BChla-B850 Moleküle [Koepke et al 1996; Gemeroth et al 1993]. Zudem ist auch der Ligand für das BChl-B800 bei *Rs. molischianum* Aspartat [Koepke et al. 1996], während es in *Rps. acidophila* 10050 an ein Methionin gebunden ist [McDermott et al. 1995]. Ihalainen konnten aufgrund dieser Daten, unter Berücksichtigung weiterer Aminosäuren in der Umgebung, die Absorptions- sowie die experimentellen CD-Spektren simulieren [Ihalainen et al 2001]. Offensichtlich ist bei derartig stark gekoppelten Systemen wie dem BChl-B850 des LH2 die einfache Excitonen-Theorie nur noch mit Einschränkungen verwendbar.

4 EXTRAKTION DES BCHL-B800 AUS LH2

Durch die seit einiger Zeit zugänglichen hochaufgelösten Kristallstrukturen der peripheren Antennenkomplexe aus *Rps. acidophila* 10050 [McDermott et. al. 1995] und 7050 [Mc Luskey et al. 2001] sowie *Rs. molischianum* [Koepke et. al. 1996] konnten viele Fragen zur Proteinstruktur und der Anordnung der Pigmente im Protein-Komplexe geklärt werden. Aber dennoch bleiben weitere Fragen offen, wie z. B. der Zusammen-hang der Struktur mit den auf biochemischem und spektroskopischem Weg gefundenen Eigenschaften für die periphere Antenne aus *Rb. sphaeroides*. Dazu sind eine Reihe zusätzlicher spektroskopischer Untersuchungen notwendig, sowohl an den nativen als auch an spezifisch modifizierten Systemen mit z.B. unterschiedlichen (photo-) chemischen und physikalischen Eigenschaften. Dabei versucht man die natürliche Struktur so zu verändern, dass möglichst wenig Parameter gleichzeitig davon betroffen sind. An Pigment-Protein-Komplexen bieten sich grundsätzlich zwei Modifikations-möglichkeiten an: Zum einen eine Veränderung der Proteine, zum anderen eine Modifikation der Pigmente im Komplex. Die vorliegende Arbeit beschreibt die gezielte Modifikation der Pigmentzusammensetzung der peripheren Antennen. Die Ergebnisse dieser Veränderungen erlauben Aussagen über die Struktur und Selektivität der pigmentbindenden Proteintaschen und ermöglichen die Einführung von Chromophoren mit unterschiedlichen funktionsrelevanten Eigenschaften (z.B. Redoxpotentiale, Absorptionsverhalten, Relaxation angeregter Zustände, Bindung ans Protein).

4.1 Optimierung der bestehenden Methode

Für den Antennenkomplex B800-850 aus *Rhodobacter (Rb.) sphaeroides* gibt es zwei unterschiedliche Möglichkeiten, selektiv das für die Absorption bei 800 nm verantwortliche monomere Bakteriochlorophyll (BChl-B800) aus dem Komplex zu entfernen. Der resultierende, an BChl-B800 verarmte Komplex wird im folgenden p(850) genannt.

Die eine Möglichkeit, einen p(850)-Komplex zu erhalten, ist eine Behandlung mit den Detergentien LDS oder SDS [Broglie et al. 1980; Clayton & Clayton 1981; Kramer et al. 1984a; Sauer & Austin 1978]. Dabei beobachtete man bei dem B800-850-Komplex von *Rb. sphaeroides* in Anwesenheit von mehr als 0.05 % LDS eine Abnahme der Absorption bei 800 nm und die Bildung einer neuen Bande bei etwa 775 – 785 nm. Es konnte bisher aber keine Antennenfraktion mit vollständiger Reduzierung der 800 nm-Bande gefunden werden.

Die andere Methode wurde von Bandilla [Bandilla et al. 1998] entwickelt. Mit ihr ist es möglich, durch Absenken des pH-Wertes von 8.0 auf 5.0 das für die Absorption bei 800 nm verantwortliche monomere Bakteriochlorophyll (BChl-B800) selektiv und vollständig

aus dem Komplex zu entfernen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Extraktion des BChl-B800 optimiert und für weitere periphere Antennenkomplexe aus anderen Purpurbakterien etabliert. Die dabei entstehenden BChl-B800 freien Pigment-Protein-Komplexe wurden zudem vergleichend untersucht.

Bei der bestehenden Methode, BChl vollständig aus der B800-Bindungstasche von *Rb. sphaeroides* zu entfernen [Bandilla et al. 1998], wurde zunächst der LH2-Komplex in LDAO-haltigem (0.1%) Tris/HCl Puffer (20 mM; pH=8.0) präpariert, anschließend das Detergens säulenchromatographisch auf Triton-BG10 umgestellt, und dann der pH-Wert mittels Essigsäure auf 5.0 eingestellt. Um eine langsame Ausfällung der Antenne und eine teilweise Bildung von Pigmentaggregaten zu verhindern, wurde dem Puffer NaCl zugefügt. Die Reaktion kann absorptionsspektroskopisch verfolgt werden. Die Inkubationszeit bei RT betrug etwa vier bis fünf Stunden. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch über DEAE-Zellulose.

Um die Extraktion des BChl aus der B800-Bindungstasche des LH2-Komplexes aus *Rb. sphaeroides* zu beschleunigen und zu vereinfachen, wurde eine Optimierung folgender Parameter angestrebt: Art des Detergens, Antennenkonzentration, pH-Wert und Temperatur. Zusätzlich wurde diese Methode auch auf die B800-820 aus *Rps. acidophila* 7750 übertragen.

4.1.1 Detergensabhängigkeit der B800-Extraktion

Die Methode, das BChl aus der B800-Bindungstasche zu entfernen, wurde ursprünglich mit dem preiswerten glykosidischen Detergens Triton-BG10 entwickelt [Bandilla et al. 1998]. Seine Eigenschaften variieren jedoch von Charge zu Charge sehr stark und es sind langwierige und teure Aufreinigungen des Detergens' erforderlich, um es für die BChl-Extraktion verwenden zu können. Auch mussten bei jeder neuen Aufreinigung oder bei Chargenwechsel die CMC und die optimalen Bedingungen von Triton-BG10 für die Extraktion erneut bestimmt werden und eine daraus resultierende Konzen-trationsanpassung erfolgen. Zusätzlich musste dem Ansatz bis zu 1 M NaCl zugefügt werden, um Ausfällungen und Aggregatbildungen der Antenne zu vermeiden. Diese Salzzugabe erschwerte aber erheblich die nachfolgende säulenchromato-graphische Aufreinigung. So musste der Komplex entweder über Nacht dialysiert oder stark verdünnt werden. Letzteres konnte jedoch zu einem erneuten Ausfällen der Probe führen, weshalb ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt eingefügt werden musste, da die ungelösten Partikel sonst die Säule verstopften, was mit erheblichen Ausbeuteverlusten verbunden war. Deshalb wurde eine Reihe unterschiedlicher Detergentien auf ihre Eignung für die Extraktion von B800 aus den LH2-Komplexen von *Rb. sphaeroides* und *Rps. acidophila* 7750 getestet (Tabelle 4-1):

Detergens	Extraktion des BChl-B800 aus LH2 von *Rb. sphaeroides*	*Rps. acidophila* 7750
n-Dodecyl-*β*-maltosid (DM)	+	+
Octyl-β-D-glycosid (OG)	+	+
Triton-BG 10	+	+
Triton-X100	-	+
CHAPS	+/-	+/-
LDAO	-	+/-
Nonidet 40	-	+/-
SB 12	-	+/-
Tween 20	-	-

Tabelle 4-1: Überblick über die Entfernung der des BChl-B800 aus LH2-Komplexen mit unterschiedlichen Detergentien. Verglichen wurden verschiedene Detergentien bei der selektiven Extraktion des BChl-B800 aus LH2 von *Rb. sphaeroides* und *Rps. acidophila* 7750 in Tris-Puffer bei pH = 5.0 und RT. +: BChl-B800 lässt sich vollständig entfernen und der entstehende p(B850)-Komplex ist stabil; -: Antenne denaturiert bei dieser Behandlung; +/-: BChl-B800 lässt sich nicht vollständig entfernen.

Zusätzlich zu dem bisher verwendeten Triton-BG10 zeigen noch die ebenfalls glykosidischen, aber chemisch definierten Detergentien *n*-Dodecyl-*β*-maltosid (DM) und Octyl-*β*-D-glycosid (β-OG) bei beiden Antennen sehr gute Ergebnisse bezüglich der BChl-B800 Extraktion und der Stabilität des entstehenden p(850)-Komplexes. Es zeigte sich, dass der LH2-Komplex aus *Rps. acidophila* 7750 verglichen mit dem Komplex aus *Rb. sphaeroides* etwas unempfindlicher auf die Wahl des Detergens reagierte. So ist die vollständige Entfernung des BChl-B800 aus der Bindungstasche von *Rps. acidophila* 7750 auch in Triton-X100 möglich, während sie in Nonidet 40, SB12, LDAO und CHAPS nur unvollständig verläuft. Diese Detergentien, mit Ausnahme von CHAPS, führen bei dem LH2-Komplex aus *Rb. sphaeroides* zu starker Denaturierung, wobei in CHAPS nur eine teilweise Entfernung der BChl-B800 möglich ist.

Aufgrund dieser Untersuchungen wurden die weiteren Versuche in DM durchgeführt. DM ist in gleichbleibender Qualität erhältlich, wodurch die Reproduzierbarkeit gegenüber den mit Triton-BG 10 durchgeführten Versuchen deutlich erhöht wurde. Darüber hinaus konnte auf die Zugabe von NaCl verzichtet werden, wodurch die Aufreinigung erheblich vereinfacht und verkürzt werden konnte und die Ausbeuten von etwa 45 % auf ca. 80 % fast verdoppelt werden konnten.

Triton-BG10, DM und β-OG zählen zu den glykosidischen Detergentien, welche besonders gut zur Solubilisierung peripherer Antennensysteme geeignet zu sein scheinen, da sie stabilisierend auf die Pigment-Protein-Komplexe wirken. Eine mögliche Erklärung könnte in

der Struktur der Detergens-Moleküle liegen: Sie sind sterisch sehr anspruchsvoll und lagern sich dadurch nur an der Antennenperipherie an. Dadurch werden die Wechselwirkungen innerhalb des LH2 nur wenig gestört.

4.1.2 Abhängigkeit der B800-Extraktion von der Antennenkonzentration

Eine möglichst rasche Extraktion des BChl-B800 aus dem Komplex ist wünschenswert, da eine längere Verweildauer im sauren Milieu zur Denaturierung des Proteins führt.

Die Zeit, die notwendig ist, um BChl vollständig aus der B800-Bindungstasche zu entfernen, ist unter anderen abhängig von der eingesetzten Antennenkonzentration (Bild 4-1).

Je höher die Antennenkonzentration ist, desto länger dauert die Abtrennung des BChl-B800. Bereits bei einer vierfachen Erhöhung der Konzentration von 2.7 µM auf 10.8 µM (OD = 0.5 cm^{-1} auf OD = 2.0 cm^{-1}) ist bei dem LH2-Komplex aus *Rb. sphaeroides* und aus *Rps. acidophila 7750* eine vollständige Pigmentextraktion auch nach 16 h noch nicht abgeschlossen. Die geeignetste Konzentration, bei der sowohl eine relativ schnelle Entfernung der B800 aus dem Komplex, als auch eine angemessene Volumengröße gewährleistet ist, beträgt 5.4 µM (OD = 1 cm^{-1}).

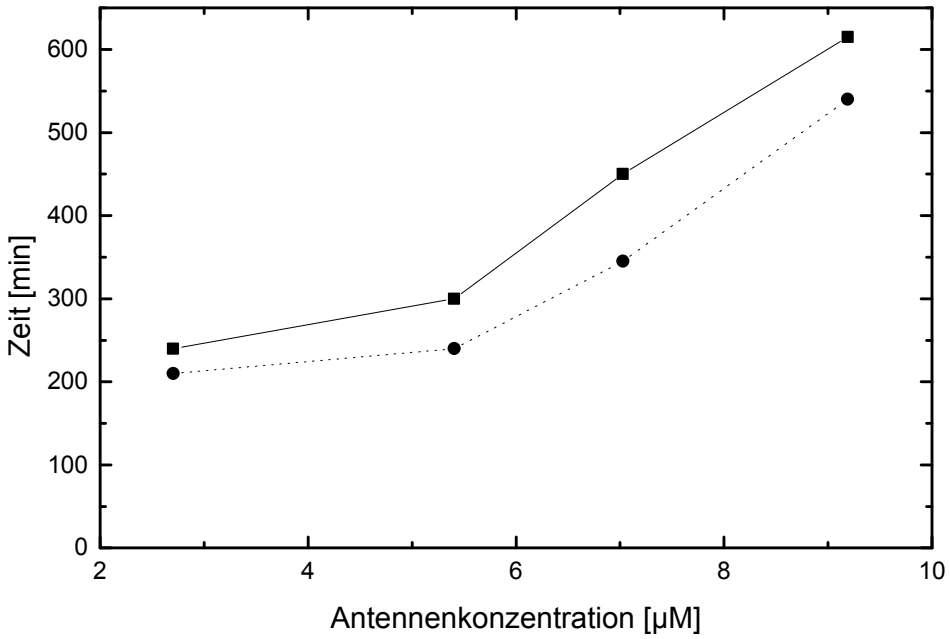


Bild 4-1 Einfluss der Antennenkonzentration auf die Dauer der selektiven BChl-B800 Extraktion aus den Antennenkomplexen von *Rb. sphaeroides* (—■—) und *Rps. acidophila* 7750 (- - ● - -) bei RT in Tris-DM-Puffer pH = 5.0. Alle 15 Minuten wurde ein Absorptionsspektrum gemessen.

4.1.3 pH-Abhängigkeit der B800-Extraktion

Bandilla [Bandilla et al. 1998] konnte zeigen, dass auch die Entfernung des BChl aus der B800-Bindungstasche in einem Triton BG-10-Puffer pH-abhängig verläuft, dabei ist unter seinen Bedingungen die Einhaltung des pH-Wertes von 5.0 entscheidend. Diese pH-Abhängigkeit wurde deshalb nochmals in einem DM-Puffer systematisch untersucht (Bild 4-2; Bild 4-3). Liegt der pH oberhalb von 5.5, ist sowohl bei *Rb. sphaeroides* als auch bei *Rps. acidophila* 7750 die Abnahme der Bande bei 800 nm nur sehr langsam. Ist der pH-Wert zwischen 5.0 und 3.0 wird bei beiden Komplexen die Extraktionszeit in etwa halbiert, dabei wird aber der Denaturierungsgrad der Antenne gleichzeitig versechsfacht. Diese Denaturierung wurde zu Beginn und nach Abschluss der Reaktion durch die Abnahme der Bande bei 850 nm bestimmt. So kann man bei beiden Antennen bereits bei einem pH-Wert von 6.0 eine Abnahme der Bande bei 850 nm von 2 – 3 % beobachten. Die Denaturierung ist säurekatalysiert. Sie steigt bis zu einem pH-Wert von 4.5 um das zwei- bis dreifache an, danach steigt sie zwischen einem pH-Wert von 4.5 und 3.0 nochmals um das fünffache, auf 31.6 % bei *Rb. sphaeroides* und 35.4 % bei *Rps. acidophila* 7750, an. Der optimale pH-Wert, der eine rasche Extraktion ermöglicht, die Denaturierung aber auf einen akzeptablen Wert begrenzt, ist 4.3 für *Rb. sphaeroides* und 4.5 für *Rps. acidophila* 7750.

Die Struktur und die Stabilität vieler Proteine hängen entscheidend vom pH-Wert ab. Die u.a. durch Wasserstoffbrücken gebildete 3-dimensionale Struktur der Proteine kann durch den Protonierungsgrad entscheidend beeinflusst werden.

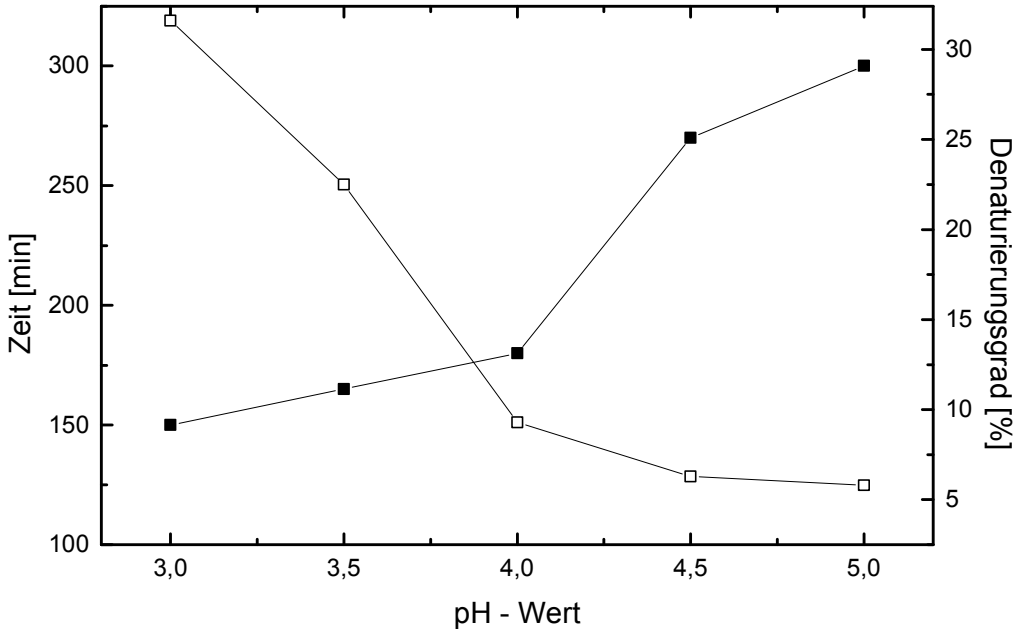


Bild 4-2: Einfluss des pH-Wertes auf die Extraktionszeit des BChl-B800 und Stabilität des entstehenden Antennenkomplexes aus *Rb. sphaeroides* bei RT in Tris/DM-Puffer (20 mM Tris/Acetat; 0.06 % DM). Alle 15 min wurde ein Absorptionsspektrum gemessen.
—■—: Zeit in Minuten bis zur vollständigen Extraktion des BChl-B800 aus *Rb. sphaeroides*; —□—: Denaturierungsgrad in % für die jeweiligen pH-Werte.

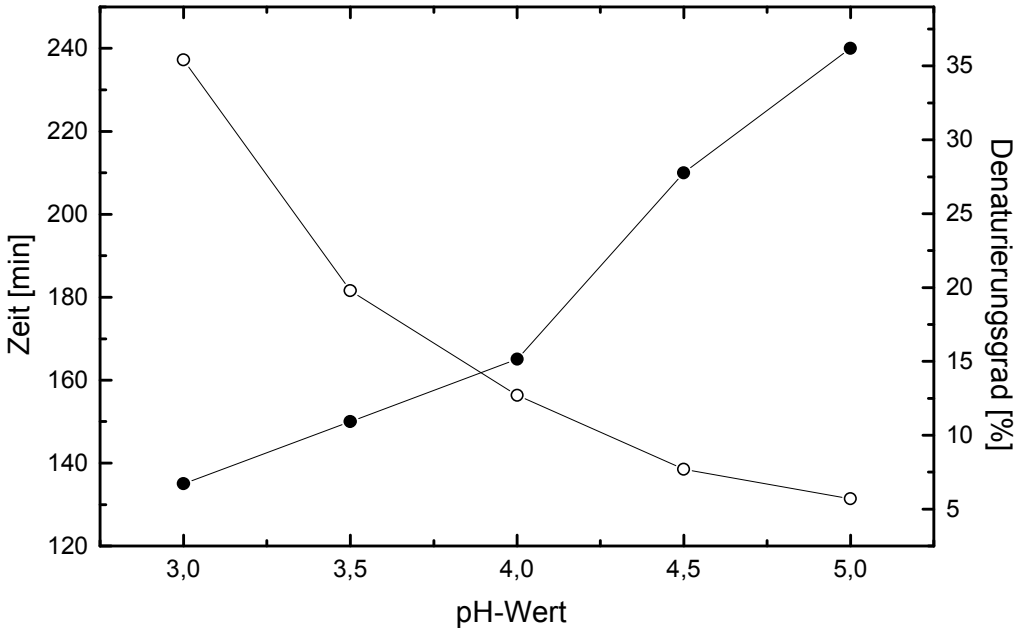


Bild 4-3: Einfluss des pH-Wertes auf die Extraktionszeit des BChl-B800 und Stabilität des entstehenden Antennenkomplexes aus *Rps. acidophila* 7750 bei RT in Tris/DM-Puffer (20 mM Tris/Acetat; 0.06 % DM). Alle 15 min wurde ein Absorptionsspektrum gemessen.
—■—: Zeit in Minuten bis zur vollständigen Extraktion des BChl-B800 aus *Rps. acidophila* 7750; —□—: Denaturierungsgrad in % für die jeweiligen pH-Werte.

4.1.4 Temperaturabhängigkeit der B800-Extraktion

Auch für die Modifikation der LH2 ist die Inkubationstemperatur entscheidend. Zu niedrige Temperaturen führen nur zu minimalen Extraktionserfolgen, selbst wenn die Reaktionsdauer wesentlich verlängert wird, und zu hohe Temperaturen bewirken eine schnelle Denaturierung der LH2 und vermindern somit die Ausbeute. In Bild 4-4 und Bild 4-5 ist die Abhängigkeit der Extraktionseffizienz von der Inkubationstemperatur für LH2 aus *Rb. sphaeroides* und *Rps. acidophila* 7750 gezeigt.

Allgemein gilt die Tendenz, je höher die Temperatur, desto schneller löst sich das BChl aus der B800-Bindungstasche der LH2, aber desto schneller denaturieren auch die Antennen. Bei einer Temperatur von 0 °C ist eine Extraktion des BChl-B800 nicht möglich. Zwischen 10 °C und 35 °C sinkt die Extraktionszeit für *Rb. sphaeroides* etwa auf $^1/_{18}$ bzw. $^1/_{26}$ für *Rps. acidophila* 7750. Gleichzeitig verdoppelt sich die Denaturierung der Antenne aus *Rb. sphaeroides* bzw. verdreifacht sich sogar für *Rps. acidophila* 7750. Der größte Sprung im Denaturierungsgrad von 9 auf 16 % findet zwischen 30 und 35 °C statt. Demzufolge wurde

für alle nachfolgenden Versuche für beide LH2-Komplexe eine Inkubationstemperatur von 30 °C gewählt, da eine Denaturierung von etwa 9 % für beide Antennen noch tolerierbar ist.

Mit höherer Temperatur sinken die polaren Wechselwirkungen im Protein, während die hydrophoben steigen. Da bei Membranproteinen vor allem polare Wechselwirkungen vorhanden sind, ist die Beweglichkeit der Polypeptide bei einem Anstieg der Temperatur erhöht, was eine leichtere und raschere Extraktion der BChl ermöglicht. So ist für den erfolgreichen Pigmentaustausch bei bakteriellen RC die Inkubations-temperatur entscheidend, welche je nach Bakterienart und Pigment optimiert werden muss, z. B. kann der Austausch in RC von *Rb. sphaeroides* R26.1 bereits bei 42 °C stattfinden, während man bei Wildtyp-RC der gleichen Art ca. 46 °C benötigt [Scheer & Struck 1993].

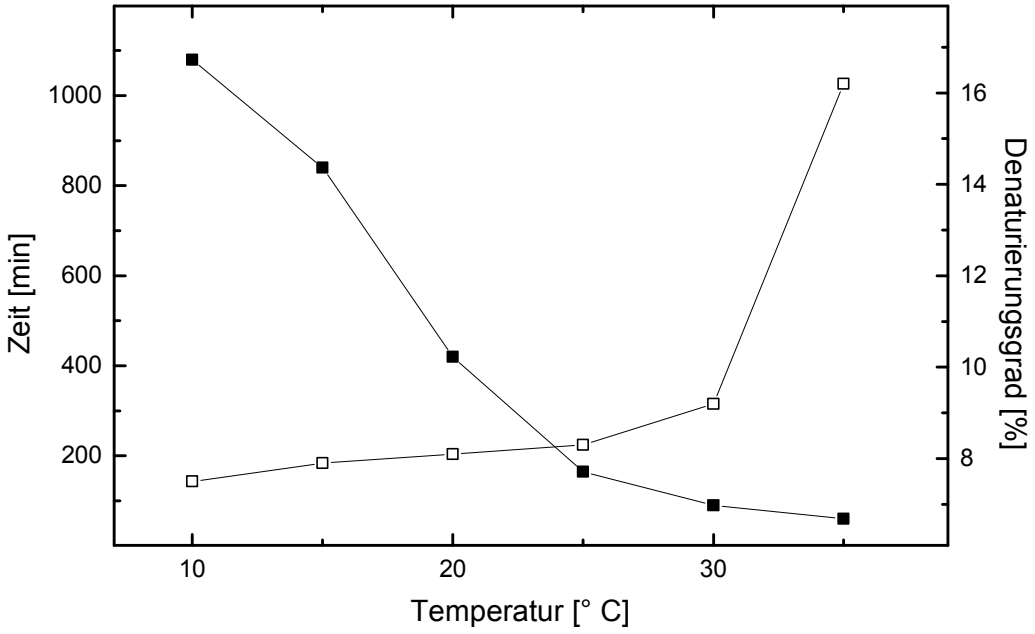


Bild 4-4: Einfluss der Temperatur auf die Extraktionszeit des BChl-B800 und Stabilität des entstehenden Antennenkomplexes aus *Rb. sphaeroides* bei RT in Tris/DM-Puffer (20 mM Tris/Acetat; 0.06 % DM). Alle 15 min wurde ein Absorptionsspektrum gemessen.
—■—: Zeit in Minuten bis zur vollständigen Extraktion des BChl-B800 aus *Rb. sphaeroides*; —□—: Denaturierungsgrad in % für die jeweilige Temperatur.

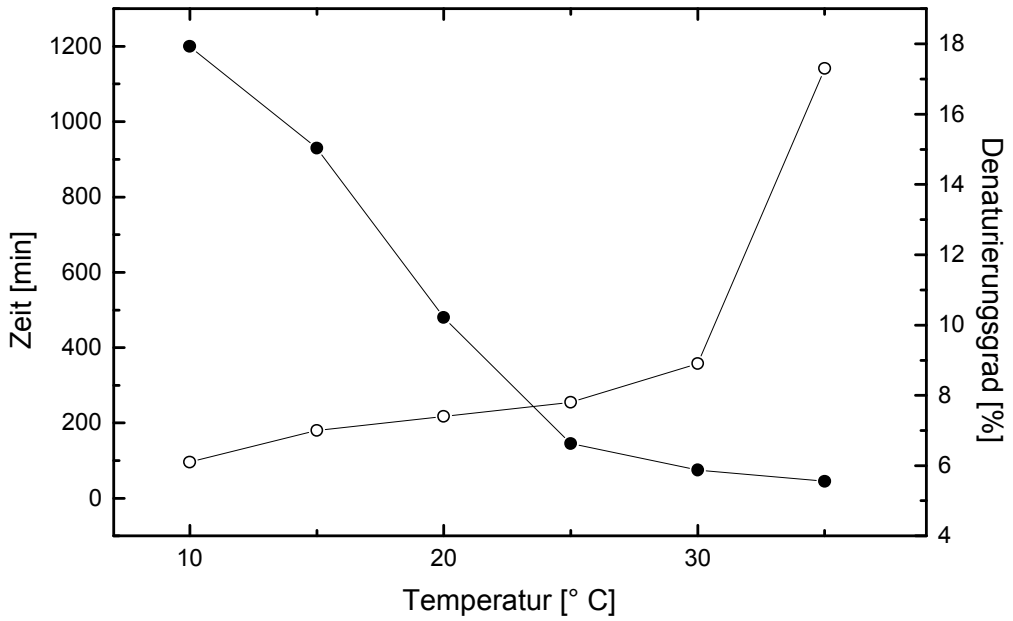


Bild 4-5: Einfluss der Temperatur auf die Extraktionszeit des BChl-B800 und Stabilität des entstehenden Antennenkomplexes aus *Rps. acidophila* 7750 bei RT in Tris/DM-Puffer (20 mM Tris/Acetat; 0.06 % DM). Alle 15 min wurde ein Absorptionsspektrum gemessen.
—■—: Zeit in Minuten bis zur vollständigen Extraktion des BChl-B800 aus *Rps. acidophila* 7750; —□—: Denaturierungsgrad in % für die jeweilige Temperatur.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Antennenkomplexe von *Rb. sphaeroides* und *Rps. acidophila* 7750 unter den getesteten Bedingungen ähnliche Tendenzen aufweisen. Die optimalen Bedingungen für die vollständige Extraktion des BChl aus den B800-Bindungstaschen von *Rb. sphaeroides* bzw. *Rps acidophila* 7750, die auch für alle nachfolgenden Experimente verwendet wurden, sind: 20 mM Tris-DM-Puffer pH = 4.3 (*Rb. sphaeroides*) bzw. 4.5 (*Rps. acidophila* 7750), bei einer Antennen-konzentration von 5.4 µM und einer Inkubationstemperatur von 30 °C. Diese Bedingungen werden im folgenden auch standardmäßig verwendet.

Fraser [Fraser et al. 1999] hat das Verfahren für *Rps. acidophila* 10050 optimiert. Seine empfohlenen Werte sind sehr ähnlich: Die Antennenkonzentration beträgt 0.7 µM, der optimale pH-Wert ist 4.75 bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C.

4.2 Charakteristika des p(850)-Komplexes aus *Rb. sphaeroides*

Die spektralen Veränderungen nach der Erniedrigung des pH-Wertes auf Werte bis zu 4.3 sind in den Bild 4-6 bis Bild 4-9 für den B800-850-Komplex aus *Rb. sphaeroides* gezeigt. Diese Antenne wurde ausgesucht, weil sie biochemisch [Zuber & Cogdell 1995; Olsen & Hunter 1994] und spektroskopisch [van Grondelle et al. 1994] gut charakterisiert ist. Eine Röntgenstruktur dieses LH2-Komplexes liegt noch nicht vor. Es wird aber angenommen, dass sie dem peripheren Antennenkomplex aus *Rps. acidophila* 10050 ähnlich ist [Cogdell, Privatmitteilung 1998].

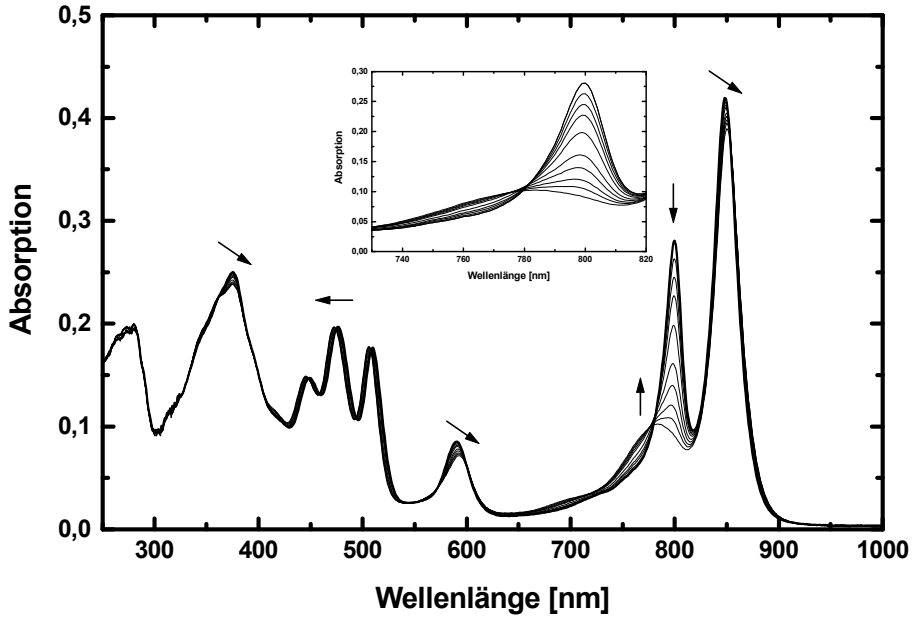


Bild 4-6: pH-abhängige Absorption des B800-850 aus *Rb. sphaeroides*. Spektrale Veränderung nach Ansäuern des TD-Puffers von pH = 8.0 auf pH = 4.3 bei 30 °C. Die einzelnen Absorptionsspektren wurden in einem Abstand von 5 Minuten aufgenommen. Der Einschub zeigt vergrössert den Ausschnitt von 730 bis 820 nm. Die Pfeile zeigen die Richtung der Verschiebung und die Veränderung der Absorption mit der Zeit.

Da die Reaktion relativ langsam verläuft, kann die Zeit, die für die pH-Einstellung benötigt wird, vernachlässigt werden.

Bei Säurezugabe nimmt die Absorption bei 798 nm zugunsten einer neuen Bande bei 780 nm stark ab, deren Breite auf freies Pigment hindeutet (Bild 4-6). Die Q_y- (850 nm) und die Q_x-Banden (≈ 600 nm) des verbleibenden BChl-B850 nehmen demgegenüber nur geringfügig ab,

gleichzeitig verschieben sie sich um wenige Nanometer (3 nm) ins Rote, während die Banden der Carotinoide (420 - 520 nm) eine Blauverschiebung von 5 nm aufweisen (Bild 4-6). Allgemein gesehen sind die spektralen Verschiebungen in den anderen Bereichen sehr gering.

Einen Hinweis darauf, dass das neu entstandene – bei 780 nm absorbierende – Pigment nicht mehr gebunden ist, ergibt sich aus dem Circulardichroismus- (CD-) Spektrum (Bild 4-7).

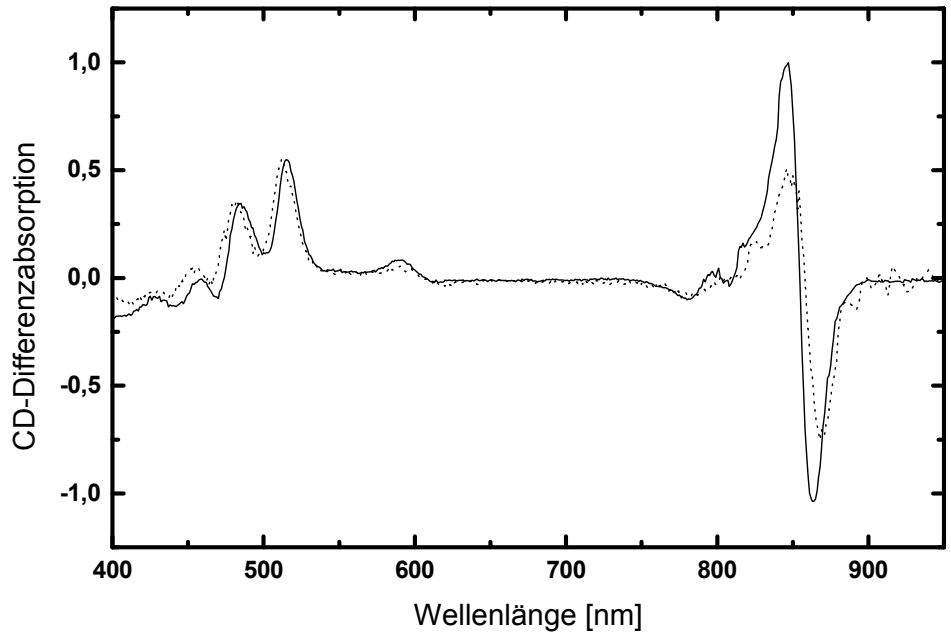


Bild 4-7: CD-Spektrum des B800-850 aus *Rb. sphaeroides* vor (——: 0 min) und nach (·····: 90 min) der pH Absenkung auf 4.3 in TD-Puffer. Es wurde dieselbe Probe gemessen wie in Bild 4-6.

Wie im Kapitel 1.5.3 erwähnt ist die optische Aktivität bei BChl-B800 in der LH2-Antenne von *Rb. sphaeroides* im Vergleich zu den Komplexen anderer Bakterien relativ gering (Bild 4-7), aber auch dieses konservative Signal verschwindet bei der Titration mit Säure. Aber es entsteht in diesem Bereich zwischen 780 – 790 nm eine breite Schulter, die auf die untere excitonische Komponente oder das Vibrations-Energielevel des BChl-B850 zurückzuführen ist [Koolhaas et al. 1998; Leupold et al. 1999]. Dagegen verringern sich die CD-Intensitäten des intensiven, sigmoidalen Signals des BChl-B850 nur um etwa 20%, was auf eine Denaturierung der Antenne schließen lässt (vgl. Bild 4-6). Die komplexen CD-Banden der Carotinoide, sowie die Q_x - und Q_y-Banden des BChl-B850 zeigen ähnliche Verschiebungen

wie sie auch im Absorptionsspektrum beobachtet werden konnten, d.h. die Kopplungen bleiben unverändert.

Einen weiteren Hinweise darauf, dass das neu entstandene Pigment nicht mehr gebunden ist, ergibt sich auch aus dem Fluoreszenzspektrum (Bild 4-8).

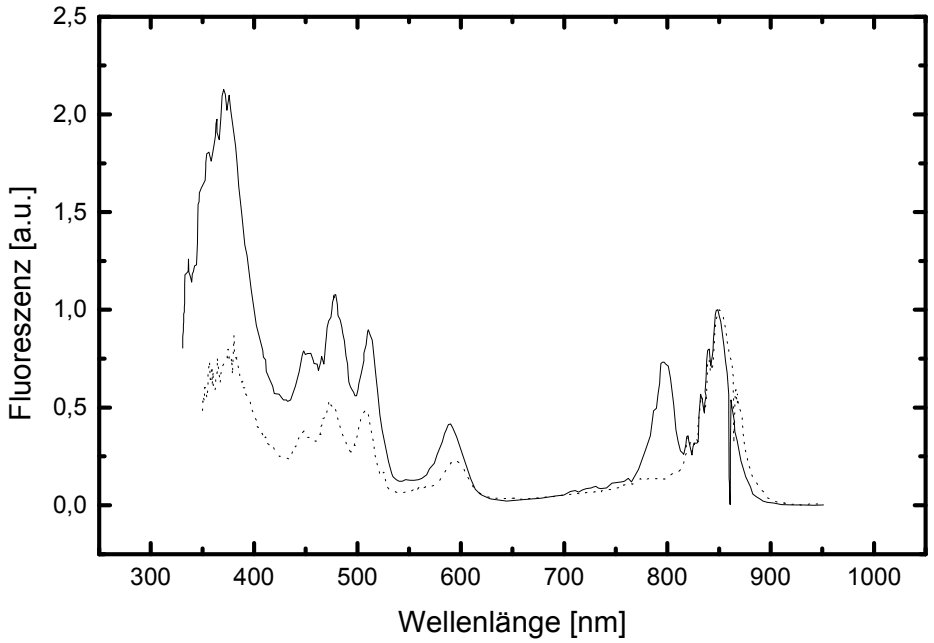


Bild 4-8: Fluoreszenz-Anregungsspektrum (Emission bei 858 nm) des B800-850 aus *Rb. sphaeroides* vor (——: 0 min) und nach (·····: 90 min) der pH Absenkung auf 4.3 in TD-Puffer. Es wurde dieselbe Probe gemessen wie in Bild 4-6.

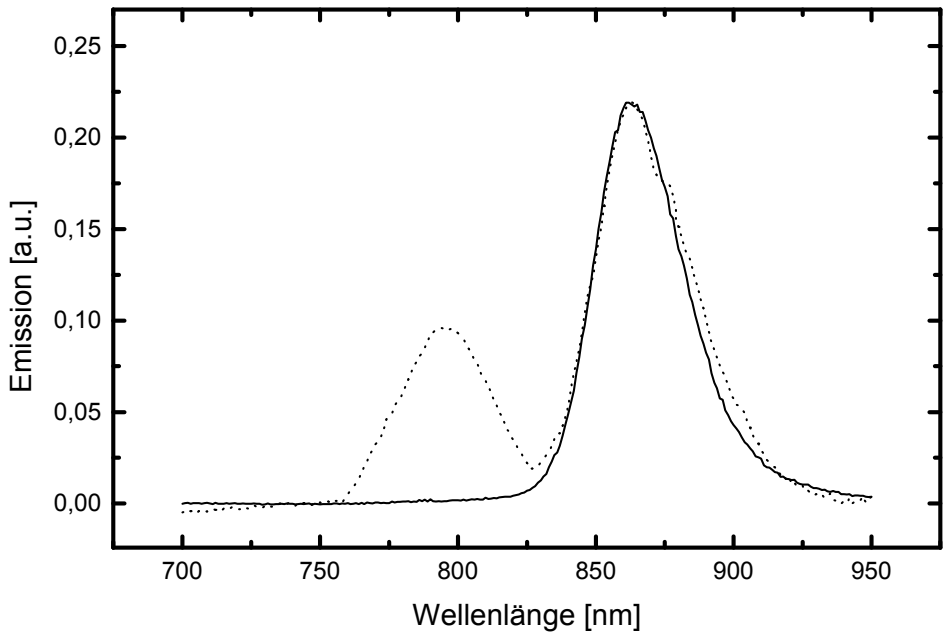


Bild 4-9: Fluoreszenz-Emissionsspektren des B800-850 von *Rb. sphaeroides* nach der vollständigen Reaktion mit Säure in TD-Puffer (·····) pH = 4.3 und nach der vollständigen Aufreinigung (——); jeweils angeregt bei 590 nm.

Im Anregungsspektrum (Bild 4-8) des angesäuerten LH2-Komplexes fehlt die Bande bei 775 nm vollständig, d.h. die Pigmente der 775 nm Bande sind energetisch nicht mehr mit den BChl-B850 gekoppelt und liegen möglicherweise als freie Pigmente vor. Die Banden der Carotinoide zeigen die gleiche Verschiebung wie im Absorptions-spektrum und sind im Anregungsspektrum auf ungefähr 50 % ihres Anfangswertes gesunken (bezogen auf die mittlere Carotinoid-Bande). Dies deutet auf eine reduzierte Fluoreszenz-Quantenausbeute ϕ_{EET} des Energietransfers von den Carotinoiden auf die BChl-B850 hin, möglicherweise aufgrund des des fehlenden BChl-B800.

Das Emissionsspektrum (Bild 4-9), das durch die Anregung in der langwelligsten Carotinoid-Bande (λ_{Ex} = 510 nm) entstanden ist, ist vergleichbar mit dem des unveränderten Komplexes (Bild 3-3). Regt man dagegen in der Q_x-Bande des BChl bei 590 nm an, erscheint eine neue Bande bei etwa 790 nm, die offensichtlich bei der Energieübertragung der Carotinoide auf das BChl keine Rolle spielt. Dies bedeutet, dass es sich bei dem Auftauchen der Bande bei 790 nm um ungekoppeltes, wahrscheinlich freies BChl handelt.

Der entscheidende Hinweis darauf, dass das neu entstandene Pigment nicht mehr gebunden ist, ergibt sich aus chromatographischen Daten. So kann das energetisch ungekoppelte, bei 775 nm absorbierende und bei 790 nm fluoreszierende BChl, das bei einem niedrigen pH-

Wert erzeugt wurde, durch eine nachfolgende Ionenaustausch-Chromatographie (DEAE-Zellulose) vollständig entfernt werden. Das führt zu einem Komplex, der keine Absorption mehr bei 798 nm aufweist und im folgenden p(850) genannt wird (Bild 4-10 und Bild 4-11 sowie Tabelle 4-2).

Abgesehen vom Fehlen der Bande bei 800 nm ist das Absorptionsspektrum (Bild 4-10; Tabelle 4-3) des aufgereinigten p(850)-Komplexes dem der ursprünglichen Antenne sehr ähnlich. Auch nach der Rücktitration auf pH 8.0 entsprechen die spektralen Verschiebungen in den BChl- und Carotinoid-Banden denen des unaufgereinigten p(850)-Komplexes (Bild 4-6). Daneben wird die deutliche Rotverschiebung der Q_x-Bande erkennbar. Zudem ist eine leichte Schulter bei 780 nm zu erkennen, was wahrscheinlich auf die obere excitonische Komponente des BChl-B850 zurückzuführen ist, da excitonische Kopplungen auch bei höher energetischen Banden vorhanden sein sollten, die normalerweise von dem BChl-B800 überlagert sind. Ein vergleichbares Signal wurde von Koolhaas in einem Tieftemperatur-CD-Spektrum bei einer *Rb. sphaeroides* Mutante, die nur eine B850-Komponente besitzt, gefunden [Koolhaas et al. 1998; Leupold et al. 1999].

	Absorption [nm]	**CD-Banden [nm]**	**Emission [nm]**
Soret	377	338(+)/368(-)/388(+)/414(-)	
Carotinoide	446/473/507	455(+)/481(+)/512(+)	
Q_x	594	592(+)/616(-)	
Q_y(BChl800)	-	-	
Q_y(BChl850)	851	784(-)/848(+)/858(0)/867(-)	864

Tabelle 4-2: Absorptions-, CD- und Emissionsmaxima des p(850)-Komplexes aus *Rb. sphaeroides* in TD-Puffer pH= 8.0. CD: (+) Maximum; (-) Minimum; (0) Schnittpunkt mit der Nulllinie.

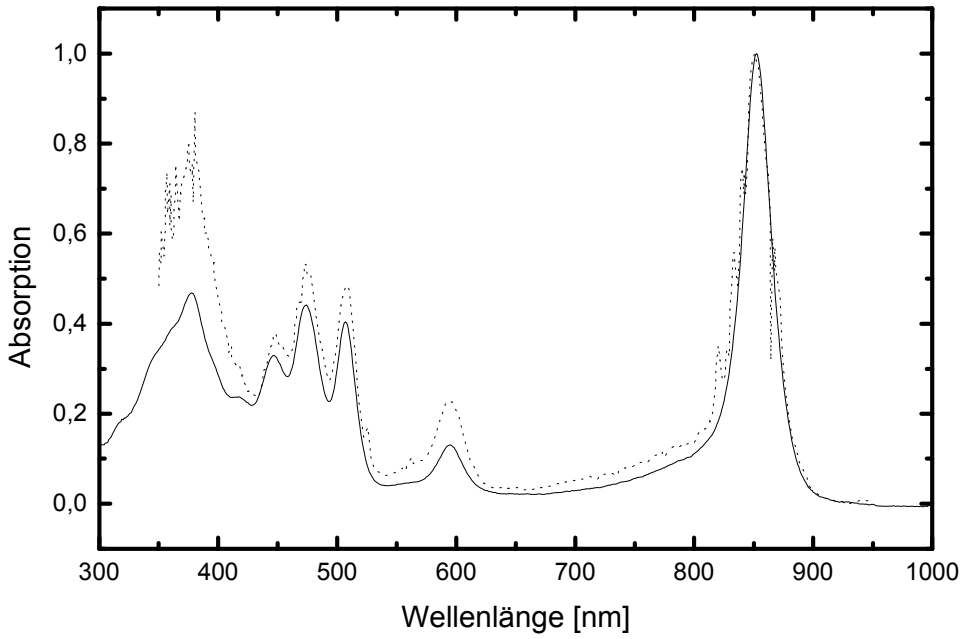


Bild 4-10: Absorptions- (——) und Fluoreszenz-Anregungsspektren (·····) (Emission bei 858 nm) des p(850)-Komplexes von *Rb. sphaeroides* in TD-Puffer pH = 8.0 nach der Ansäuerung auf pH = 4.3, der anschließenden chromatographischen Aufreinigung und der Rücktitration auf pH = 8.0.

Im CD-Spektrum der aufgereinigten p(850) (Bild 4-7; Bild 4-11;Tabelle 4-2) ist neben den CD-Banden der Carotinoide – positive Banden bei 455, 481 und 512 nm; der Soret-Bande des BChl – positive Banden bei 338 und 388 nm und negative Banden bei 368 und 414 nm –, der Q_x-Bande bei 592 nm und der eigentlichen Q_y-Banden des BChl-B850 – positive Bande bei 848 und negative Bande bei 867 nm – nach wie vor eine Bande bei 784 nm zu sehen. Deren Zuordnung weit mehr dem von Koolhaas und Leupold [Koolhaas et al. 1998; Leupold et al. 1999] postulierten excitonischen Komponente entspricht als dem freien Pigment und/oder dem BChl-B800.

Die langwellige Emission und das Fluoreszenz-Anregungsspektrum der p(B850) gleichen denen der unaufgereinigten Probe. Im Emissionsspektrum (Bild 4-9), das in der Q_x-Bande bei 590 nm angeregt wurde, findet man aber nur eine Bande bei 864 nm, d.h. es konnte keine Emission von freiem Pigment bei etwa 790 nm gefunden werden. Damit kann davon ausgegangen werden, dass kein freies Pigment mehr vorhanden ist. Bei dem Emissionsspektrum des aufgereinigten p(850)-Komplexes (Bild 4-9) ist zudem die Bande bei etwa 805 nm, die durch das BChl-B800 verursacht wurde, wie erwartet auch verschwunden.

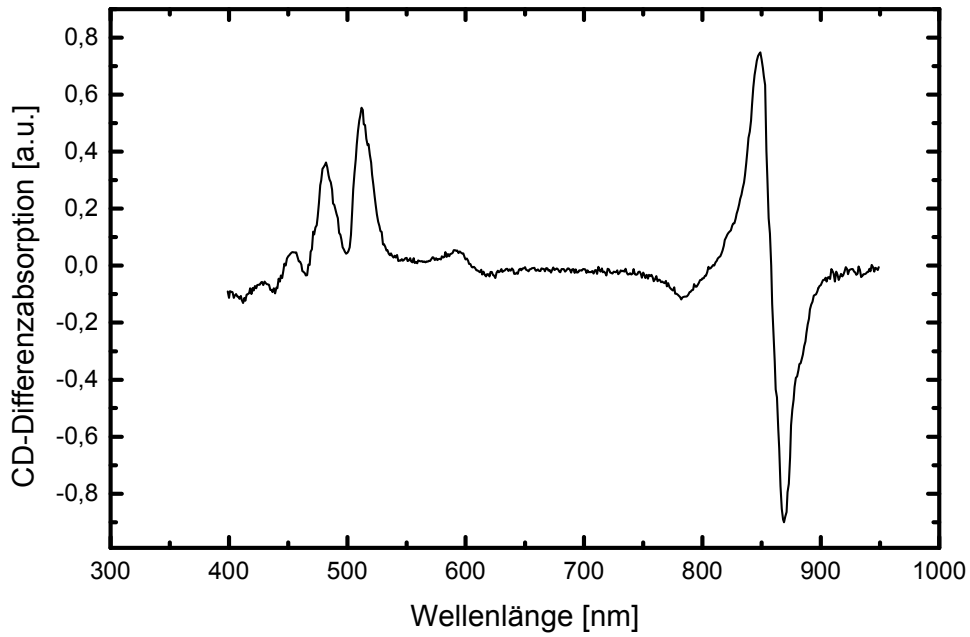


Bild 4-11: CD-Spektrum des p(850)-Komplexes von *Rb. sphaeroides* in TD-Puffer pH = 8.0, erhalten durch Ansäuerung auf pH = 4.3, der anschließenden chromatographischen Aufreinigung und der Rücktitration auf pH = 8.0. Es wurde dieselbe Probe gemessen wie in Bild 4-10.

	Absorption [nm]	**CD-Banden [nm]**
Soret		
Carotinoide	441-/455+/468-/485+/502-/517+	448-/462+/472-/493+/507-/518+
Q_x	586+	587+
Q_y(BChl800)	800+	797+/808-
Q_y(BChl850)	840+/859-	842+/858-

Tabelle 4-3: Absorptions- CD- und Emissionsmaxima des aufgereinigten p(850)-Komplexes aus *Rb. sphaeroides* in TD-Puffer pH= 8.0. CD. (+) Maximum; (-) Minimum; (0) Schnittpunkt mit der Nulllinie.

4.3 Extraktionsversuche bei LH2-Komplexen aus anderen Organismen

Die periphere Antenne LH2 ist bei Purpurbakterien vergleichsweise variabel und wird bei einigen Spezies durch differentielle Expression einer Multi-Gen-Familie qualitativ reguliert [Hunter et al. 1995], welche z.T. für unterschiedlich absorbierende Komplexe codiert. Da für einige dieser Komplexe hochaufgelöste Strukturen bekannt sind (Kapitel 1.3) und weitere zur Zeit kristallisiert werden, haben wir diese bezüglich der Extrahierbarkeit des BChl-B800 vergleichend untersucht.

Bakterienart	**Antennentyp**	**Extrahierbarkeit von BChl-B800**
Rps. palustris French (HL)	B800-850 Typ I	Komplex instabil
Rps. palustris French (LL)	B800-860 Typ II	Komplex instabil
Rps. palustris DSM	B800-850 Typ II	Komplex instabil
Rps. cryptolactis	B800-820 Typ II	Komplex instabil
Rc. gelatinosus	B800-850 Typ I	+
Rps. acidophila 7750 (HL)	B800-860 Typ I	+
Rps. acidophila 7750 (LL)	B800-820	+
Rps. acidophila 10050	B800-850 Typ I	+
Chromatium purpuratum	B800-830	Komplex instabil
Rb. sphaeroides	B800-850 Typ I	+
Rs. molischianum	B800-850 Typ I	keine Reaktion

Tabelle 4-4: Reaktivitäten von LH2-Komplexen gegenüber Säure. Die verschiedenen Typen von Komplexen sind folgendermaßen definiert: Typ I: $A_{800} < A_{850}$; Typ II $A_{800} > A_{850}$. Komplex instabil: BChl-B800 lässt sich nicht selektiv aus dem Komplex entfernen; +: BChl-B800 lässt sich nach Absenken des pH-Wertes selektiv extrahieren.

Bakterien	Q_y-Absorption		CD-Signal		Energietransfer von	
	800	850	800	850	800 nach B850	Car
Rb. sphaeroides	-	↘	-	↘	-	↓
***Rps. acidophila* 10050**	-	↘	-	↘	-	↓
***Rps. acidophila* 7750**	-	↘	-	↘	-	↓
Rc. gelatinosus	-	↘	-	↘	-	↓
Rs. molischianum	±	±	±	±	±	±

Tabelle 4-5: Spektrale Veränderungen der unterschiedlichen LH2-Komplexe, bei denen sich das BChl-B800 durch pH-Absenkung selektiv extrahieren lässt. -: keine Absorption/kein Energietransfer; ±: keine spektrale Veränderung; ↘: Abnahme der Absorption und Rotverschiebung; ↓: Energietransfer von den Carotinoiden nimmt ab.

Die Ergebnisse sind in den Tabelle 4-4 und Tabelle 4-5 zusammengefasst: Die Reaktion der pH-abhängigen selektiven Abnahme der Absorption bei 800 nm und die Extraktion des BChl-B800 vom Pigment-Komplements, wie sie bereits für die LH2 - Komplexe aus *Rb. sphaeroides* und *Rps. acidophila* 7750 durchgeführt wurde, ließ sich auch auf die LH2-Komplexen aus *Rps. acidophila* 10050 und *Rhodocyclus (Rc.) gelatinosus* (Tabelle 4-4 und Tabelle 4-5) übertragen: Die Absorption bei 800 nm nimmt selektiv ab und es erscheint ein neuer Peak bei 780 nm. Die Intensitäten der BChl-B850 Banden – Q_y bei etwa 850 nm und Q_x bei ca. 590 nm - nehmen leicht ab und sind rotverschoben, die Banden der Carotinoide – zwischen 450 und 550 nm - sind leicht blauverschoben. Der Energietransfer zwischen den Carotinoiden und den BChl-B850 ist eingeschränkt. Die neu entstandene Bande bei 780 nm lässt sich durch Ionenaustausch-Chromato-graphie entfernen, wodurch man auch bei diesen Antennen einen sauberen p(850)- bzw. p(820)-Komplex erhält (Bild 4-12 und Bild 4-13 sowie Tabelle 4-6 und Tabelle 4-7). Diese Befunde deuten auf eine ähnliche Organisation, wie sie bei *Rb. sphaeroides* vorliegt, hin. Eine Reihe von Komplexen zerfallen, wobei die Intensitäten in allen Absorptions- und CD-Banden gleichmäßig abnehmen und bei der Aufreinigung nur noch freies oder unspezifisch gebundenes Pigment gefunden werden kann. Eine Ausnahme im Vergleich zu allen getesteten LH2-Komplexen ist der aus *Rs. molischianum*, dessen Kristallstruktur bekannt ist [Koepke et al. 1996]. Er ist sehr stabil, wobei er bis pH 4.3 keine spektralen Veränderungen zeigt, und er zerfällt erst bei weiterer Absenkung des pH unterhalb von 2.5 unter Freisetzung beider BChl-Pigment-Pools. Für

diesen Komplex ist deshalb die selektive Extraktion des BChl-B800 durch pH-Änderung nicht möglich.

Die entstandenen p(850)- bzw. p(820)-Komplexe aus *Rps. acidophila* 10050, *Rps. acidophila* 7750 und *Rb. sphaeroides* wurden näher untersucht.

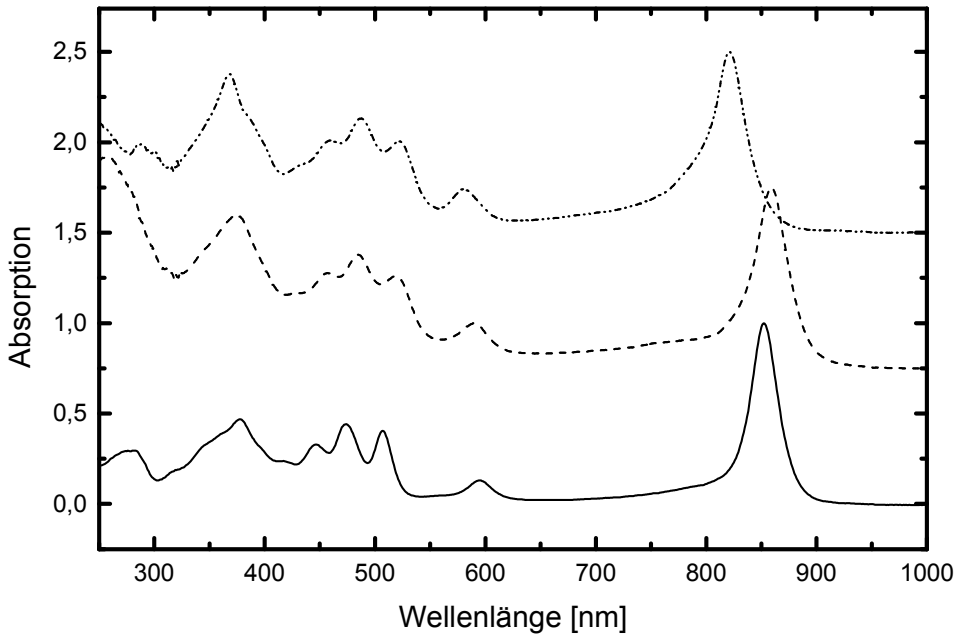


Bild 4-12: Absorptionsspektren des aufgereinigten des p(820)-Komplexes aus *Rps. acidophila* 7750 (- • • -) und der aufgereinigten p(850)-Komplexe aus *Rps. acidophila* 10050 (• • •) und *Rb. sphaeroides* (—) in TD-Puffer pH 8.0.

Die Absorptionsspektren (Bild 4-12; Tabelle 4-6) des p(850) aus *Rps. acidophila* 10050 bzw. p(820) aus *Rps. acidophila* 7750 sind, verglichen mit denen der ursprünglichen Antennen (Bild 3-1 und Tabelle 3-1) nach der Aufreinigung und der anschließenden Rücktitration auf pH 8.0 sehr ähnlich, sieht man vom Fehlen der BChl-B800 Bande ab. Es finden sich auch hier vergleichbare spektrale Verschiebungen wie in *Rb. sphaeroides.* So zeigt sich eine geringe Blauverschiebung im Bereich der Carotinoide und eine Rotverschiebung in der Q_x- bzw. Q_y-Bande des BChl. Diese spektralen Verschiebungen in den Carotinoid- und den BChl-Banden bleiben auch nach der Aufreinigung und der Rücktitration auf pH 8.0 erhalten. Bei dem p(850)-Komplex aus *Rps. acidophila* 10050 findet sich eine leichte Schulter im Bereich von 780 nm, was auch hier auf die obere excitonische Komponente des BChl-B850

zurückzuführen ist [Koolhaas et al. 1998; Leupold et al. 1999]. Bei dem p(820)-Komplex aus *Rps. acidophila* 7750 scheint diese wohl unter der Hauptbande verborgen zu sein.

		Wellenlängen [nm]			
Bakterienart	**Soret**	**Carotinoide**	**Q_x**	**Q_y(B800)**	**Q_y(B850)**
***Rps. acidophila* 7750**	370	461/488/523	581	-	821 (Em 838)
***Rps. acidophila* 10050**	377	458/485/520	594	-	861 (Em 876)
Rb. sphaeroides	377	446/473/507	594	-	851(Em 864)

Tabelle 4-6: Charakteristische Absorptions- und Fluoreszenz-Emissionsbanden (angeregt in der langwelligsten Carotinoid-Bande) der aufgereinigten p(850) bzw. P(820)-Komplexe aus *Rps acidophila* 7550, *Rps. acidophila* 10050*, Rb. sphaeroides*.

In den Anregungsspektren des p(850) bzw. des p(820)-Komplexes aus beiden *Rps. acidophila* Stämmen fehlen, wie bei dem p(850)-Komplex aus *Rb. sphaeroides,* die Bande bei 800 nm vollständig. Die Verschiebungen im Bereich der Carotinoide und der Q_x- bzw. Q_y-Bande sind analog zu denen im Absorptionsspektrum. Auch hier sind die Banden der Carotinoide im Anregungsspektrum auf ungefähr 50 % ihres Anfangswertes gesunken (bezogen auf die mittlere Carotinoid-Bande). Dies lässt auf einen reduzierten Energietransfer von den Carotinoiden auf die BChl-B850 schließen. Die Emissions-spektren, die durch die Anregung in der langwelligsten Carotinoid-Bande (λ_{Ex} = 510 nm) entstanden sind, sind vergleichbar mit dem der nativen Komplexe (Bild 3-1), es zeigt sich lediglich eine geringe Rotverschiebung.

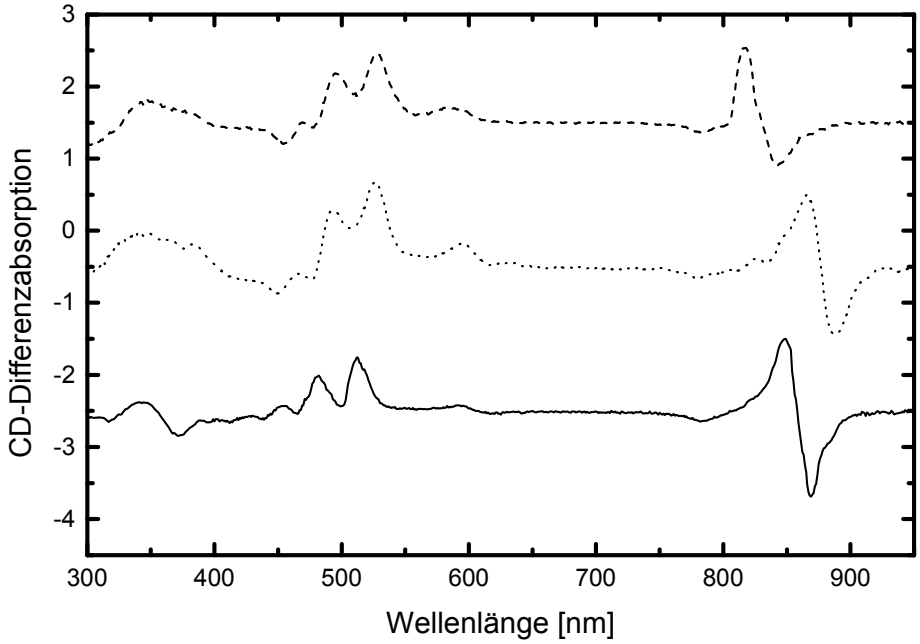


Bild 4-13: CD-Spektren des aufgereinigten des p(820)-Komplexes aus *Rps. acidophila* 7750 (- • • -) und die aufgereinigten p(850)-Komplexe aus *Rps. acidophila* 10050 (• • •), *Rb. sphaeroides* (—) in TD-Puffer pH 8.0.

	Wellenlänge [nm]				
Bakterienart	**Soret**	**Carotinoide**	**Q_x**	**Q_y(B800)**	**Q_y(B850)**
***Rps. acidophila* 7750**	350(+)/399(-)	456(-)/483(-) 503(+)/533(+)	591(+)	-	785(-)/818(+) 830(0)/843(-)
***Rps. acidophila* 10050**	346(+)/385	453(-)/479(-) 495(+)/528(+)	599(+)	-	783(-)/867(+) 878(0)890(-)
Rb. sphaeroides	345(+)/373(-) 391(+)/414(-)	439(-)/466(-) 482(+)/513(+)	592(+)	-	784(-)/849(+) 858(0) 869(-)

Tabelle 4-7: Charakteristische CD-Banden der aufgereinigten p(850) bzw. P(820)-Komplexe aus *Rps acidophila* 7550, *Rps. acidophila* 10050, *Rs. molischianum, Rb. sphaeroides*(+). CD-Maxima, (-) Minima, (0): Schnittpunkt mit der Nulllinie.

In Bild 4-13 und Tabelle 4-7 sind die CD-Spektren im NIR der beiden aufgereinigten p(850)-Komplexe aus *Rps. acidophila* 10050 und *Rb. sphaeroides*, sowie der p(820)-Komplex aus *Rps. acidophila* 7750 dargestellt. Das CD-Signal, das dem Q_y-Übergang des BChl-B850 bzw. BChl-B820 zugeordnet wird (Bereich zwischen 820 und 920 nm), beinhaltet jeweils eine positive Bande mit einem Maximum zwischen 815 nm und 870 nm und eine negative Bande mit einem Minimum zwischen 840 und 890 nm. Die negative Bande des BChl-B800 zwischen 780 und 810 nm ist verschwunden, zurück bleibt, genau wie bei dem p(850)-Komplex aus *Rs. sphaeroides,* bei den beiden analogen Verbindungen aus *Rps. acidophila* eine Bande bei etwa 784 nm. Das CD-Signal, das für den Soret-Bereich (300 - 450 nm) verantwortlich ist, ist in den nativen Komplexen (Bild 3-2 und Tabelle 3-2) sehr gut aufgelöst, in den p(850)- bzw. p(820)-Komplexen zeigt dieses eine wesentlich geringere Feinstruktur. Die CD-Signale der Carotinoide (Bereich zwischen 450 - 550 nm) zeigen Muster aus intensiven, sich überlagernden positiven und negativen Banden, deren Wellenlängen nicht mit denen der Absorptionsbanden übereinstimmen. Wie im Absorptionsspektrum sind die Maxima der Carotinoide nach der Extraktion des BChl-B800 im p(850)- bzw. p(820)-Komplex um etwa 4 nm blauverschoben.

4.4 Diskussion

Anders als durch die Detergentien LDS oder SDS [Broglie et al. 1980; Clayton & Clayton 1981, Kramer et al. 1984a, Sauer & Austin 1978], kann das BChl-B800 durch Inkubation in saurem Milieu aus den peripheren Antennenkomplexen der Bakterien-gattungen *Rb. sphaeroides*, den beiden *Rps. acidophila* 10050, 7750 und *Rc. gelatinosus* vollständig abgetrennt werden. Dadurch konnten Komplexe isoliert werden, bei denen das monomere BChl-B800 fehlt. Sie werden im folgenden p(850)- bzw. p(820)-Komplexe genannt. Aus dem B800-850-Komplex aus *Rs. molischianum* konnte nach dieser Methode keine analoge Verbindung gebildet werden.

Die aus *Rb. sphaeroides*, den beiden *Rps. acidophila* 7750 und 10050 sowie aus *Rc. gelatinosus* entstandenen p(850) bzw. p(820)-Komplexe sind in Detergentien wie LDAO, SDS oder Triton-X100 instabil, das heißt dass diese modifizierte Antenne wesentlich empfindlicher auf Detergentien reagiert als die ursprünglichen B800-850 bzw. 800-820-Komplexe.

Die Spektren der p(850)- bzw. p(820)-Komplexe wurden in TD-Puffer pH = 8.0 aufgenommen (Bild 4-9 -Bild 4-11). Dabei zeigen die Absorptions- CD- und Fluoreszenzspektren keinerlei Unterschiede zu denen bei pH = 5.0 (Bild 4-6 -Bild 4-8). Die dabei beobachteten Verschiebungen in den Carotinoid-Banden und der Q_y-Bande des BChl-

B850 der aufgereinigten p(850) bzw. p(820)-Komplexe (Bild 4-9 -Bild 4-11) gegenüber den jeweiligen nativen Komplexen (Bild 3-2 und Tabelle 3-2) sind demnach keine pH-abhängigen oder durch das Detergens verursachten Artefakte. Allein der Verlust der BChl-B800 ist für diese spektralen Veränderungen verantwortlich. Mögliche Erklärungen sind zum einen eine veränderte Struktur der Antenne nach Verlust der BChl-B800. Eine andere Begründung wäre eine schwache Kopplung der anderen Pigmente mit dem BChl-B800, die nach dessen Entfernung fehlt.

Um zu klären, ob die für die Extraktion des BChl-B800 aus seiner Bindungstasche notwendigen sauren Bedingungen die Struktur des LH2-Komplexes beeinflusst haben, ist es wichtig, die quartäre Struktur des Pigment-Protein-Komplexes p(850) bzw. p(820) zu untersuchen. In den nativen LH2-Komplexen, haben sowohl die BChl als auch die Carotinoide aufgrund ihrer Kopplung bzw. Konformation sehr starke CD-Signale [Cogdell & Scheer 1985]. Änderungen in der Anordnung und der Position der Chromophore in den p(850)- bzw. p(820)-Komplexen wurden durch den Vergleich der CD-Signale im NIR und in den sichtbaren Bereichen mit den der nativen Komplexe festgestellt.

Bemerkenswert ist, dass im CD-Spektrum des p(850) bzw. p(820) eine breite negative Bande, die bei etwa 784 nm lokalisiert ist (Bild 4-11 und Bild 4-13, sowie Tabelle 4-7) zurück bleibt, sogar nach der vollständigen Entfernung des freien Pigments. Ein ähnliches Signal wurde bereits früher durch Koolhaas [Koolhaas et al. 1998] in einem Tieftemperatur-CD-Spektrum von *Rb. sphaeroides* Mutanten, die nur eine B850-Komponente aufweisen, nachgewiesen. Desweiteren wurden diese in Kalkulationen basierend auf den Röntgenstruktur-Daten von *Rps. acidophila* [Alden et al. 1997; Sauer et al. 1996], gefunden. Dieses Signal wurde der oberen excitonischen Komponente der BChl-B850 Absorption zugeordnet. Die ähnliche Lage und Intensität der Banden ist ein weiteres Argument für die verwandte Struktur.

Da die CD-Banden im Bereich der Carotinoide nach der Extraktion des BChl-B800 im p(850)- bzw. p(820)-Komplex gegenüber den jeweiligen nativen Komplexen (Bild 3-2 und Tabelle 3-2) lediglich um einige nm blauverschoben sind, sich aber die Struktur der Banden nicht verändert, liegt die Vermutung nahe, dass weder die Konformation der Carotinoide durch die BChl-B800 Extraktion beeinträchtigt wurde, noch scheinen die Carotinoid-Carotinoid-Wechselwirkungen, als auch die Carotinoid-BChl-Wechsel-wirkungen in den nativen und in den p(850)- bzw. p(820)-Komplexen gleich zu sein. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass in den beiden Komplexen die allgemeine Gesamtstruktur nicht verändert ist.

Dieses Ergebnisse bestätigen experimentell die theoretischen Vorhersagen, nach denen nur eine geringe Kopplung zwischen den BChl-B800 und den BChl-B850 bzw. BChl-B820 besteht [Sauer et al. 1996; Nagarajan et al. 1996; Ihalainen et al. 2001]. Es bestätigt gleichzeitig die zunächst aufgrund der relativen Bandenintensitäten getroffene Zuordnung von

BChl-B800 zu dem “monomeren” Ring. Obwohl die BChl-B800 mehr in der Mitte der Membran liegen und damit nach der Solubilisierung dem Detergens exponierter sind, sind sie schwächer an den Proteinkomplex gebunden als die 18 BChl-B850.

Dem (p)B850- bzw. p(820)-Komplex fehlt das monomere BChl, es bleibt nur der dicht-gepackte Ring aus 18 excitonisch gekoppelten BChl übrig. Diese Komplexe waren und sind von erheblicher Bedeutung für die Untersuchung der elektronischen Struktur des hochaggregierten BChl-B850, für welches Banden mit geringer Intensität im 800 nm Bereich postuliert wurden [Sauer et al. 1996; Braun & Scherz 1991; Koolhaas et al. 1998; Nagarajan et al. 1996; Leupold et al. 1999], die aber unter der Absorption des BChl-B800 bisher nicht sichtbar waren. Es konnte eine starke Kopplung des ring- oder propellerförmigen 18mers gefunden werden, welches unmittelbar nach der Anregung eine Kohärenzlänge, d.h. eine Delokalisierung des Excitons nahe dem Maximalwert von 18 zeigt. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um die bisher vergeblich gesuchte obere Excitonenbande des BChl-B850 Systems. Diese Zuordnung konnte durch Nichtlineare Polarisationsmessungen der p(850) aus *Rb. sphaeroides* nachgewiesen werden [Leupold et al. 1999]. Hinweise auf excitonische Banden in diesem Bereich wurden auch durch gezielte Mutagenese gefunden [Koolhaas et al. 1998], die Wellen-längen stimmen jedoch nicht genau überein und deuten auf gewisse Umorganisationen der Pigmente innerhalb des LH2 hin.

Die p(850)- bzw. p(820)-Komplexe sind weiterhin geeignet, den direkten Energie-transfer von den Carotinoiden auf die BChl-B850 zu untersuchen. Der exakte Mechanismus wird wegen der bisher nur indirekt zugänglichen Lage der ^{1}S-Bande stark diskutiert, wobei noch keine eindeutige Klärung erreicht werden konnte [Andersson et al. 1996, Frank et al. 1999]. Zudem dienen diese Komplexe als Kontrollprobe für die Untersuchung des B800 $\rightarrow$ B850 Energietransfers [Herek et al. 2000].

5 REKONSTITUTION MIT MODIFIZIERTEN PIGMENTEN IN LH2

Ein wesentliches Ziel der Arbeiten war die Präparation von LH2-Komplexen, in denen die nativen Pigmente (selektiv oder vollständig) durch modifizierte ersetzt sind. Solche pigmentmodifizierten Präparate trugen entscheidend zur funktionellen Untersuchung der Primärprozesse in Reaktionszentren aus *Rb. sphaeroides* bei [Scheer & Hartwich 1995]. Im Gegensatz zur Kernantenne LH1 einiger Purpurbakterien [Davis et al. 1996] und der LHCII-Antenne grüner Pflanzen [Paulsen 1995] gab es bisher kein geeignetes Verfahren zur Modifizierung der Pigmente in LH2.

Wie in Kapitel 4 gezeigt, wurde von M. Bandilla eine Methode entwickelt, mit der es möglich ist, selektiv das für die Absorption bei 800 nm verantwortliche monomere Bakteriochlorophyll (BChl-B800) aus dem Antennenkomplex B800-850 aus *Rb. sphaeroides* Komplex zu entfernen [Bandilla et al. 1998]. Darüber hinaus gelang es ihm, diese freigewordene Bindungsstelle durch modifizierte Pigmente wieder zu besetzen. Ausgehend von dem BChl-B800-freien Komplex (p)B850 aus *Rb. sphaeroides* (s. Kapitel 4.2) wurden mehrere Verfahren zur Rekonstitution der B800-Bindungsstelle mit modifizierten Pigmenten entwickelt [Bandilla et al. 1998]. Dabei kann man grundsätzlich zwei Methoden unterscheiden: In einem Fall wird das bei pH 4.8 freigesetzte BChl nicht entfernt, und die Probe nach Zusatz eines modifizierten Pigments (im Überschuss) auf pH 8 titriert. Man erhält so eine vollständige Wieder-besetzung der B800-Bindungsstellen, wobei diese aber mit einem Gemisch aus BChl und dem modifizierten Pigment besetzt werden. Im zweiten Fall wird zunächst das bei pH 4.3 freigesetzte BChl säulenchromatographisch entfernt und es entsteht der p(850)-Komplex, dem anschließend das modifizierte Pigment zugesetzt wird. Nach der Erhöhung des pH-Wertes auf 8.0 erhält man Präparationen mit einer homogenen Besetzung der B800-Bindungsstellen mit modifizierten Pigmenten. Die Besetzungszahl bei LH2 aus *Rb. sphaeroides* war allerdings bisher auf ≤ 50% limitiert. Für einige Experimente, wie Raman-Präresonanz-Messungen oder Untersuchungen zum Energie-transfer zwischen den Antennen und den RCs sind solche kleinen Besetzungszahlen von Interesse.

Um einen homogenen Pigmentaustausch von mehr als 50 % zu erreichen, wurde der Einbau veränderter (B)Chl in die BChl-B800-Bindungstasche optimiert. Zusätzlich wurde er für die peripheren p(820)- bzw. p(850)-Antennenkomplexe aus anderen Purpurbakterien etabliert.

5.1 Optimierung der Rekonstitution mit BChl bei *Rb. sphaeroides*

Für die Optimierung der Rekonstitution wurde ausschließlich der aufgereinigte p(850)-Komplex (s. Kapitel 4.2) eingesetzt. Bandilla führte diesen Versuch in Tris-Puffer pH 8.0 durch, dem als Detergens Triton-BG 10 zugesetzt war [Bandilla et al. 1998]. Anschließend musste ein Detergenzwechsel von Triton-BG 10 auf LDAO durchgeführt werden, um Eintauschraten von maximal 50 % zu erreichen.

Dieses System wurde optimiert, indem der Einfluss von Detergens, Antennen- und Pigmentkonzentration und Temperatur auf die Rekonstitutionsrate untersucht wurde. Als extern zugeführtes Pigment bot sich BChl an, das ursprüngliche Pigment der B800-Bindungstasche. Die Eintauschrate wurde nach chromatographischer Aufreinigung über DEAE-Zellulose mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie ermittelt (s. Kapitel 2.1.3).

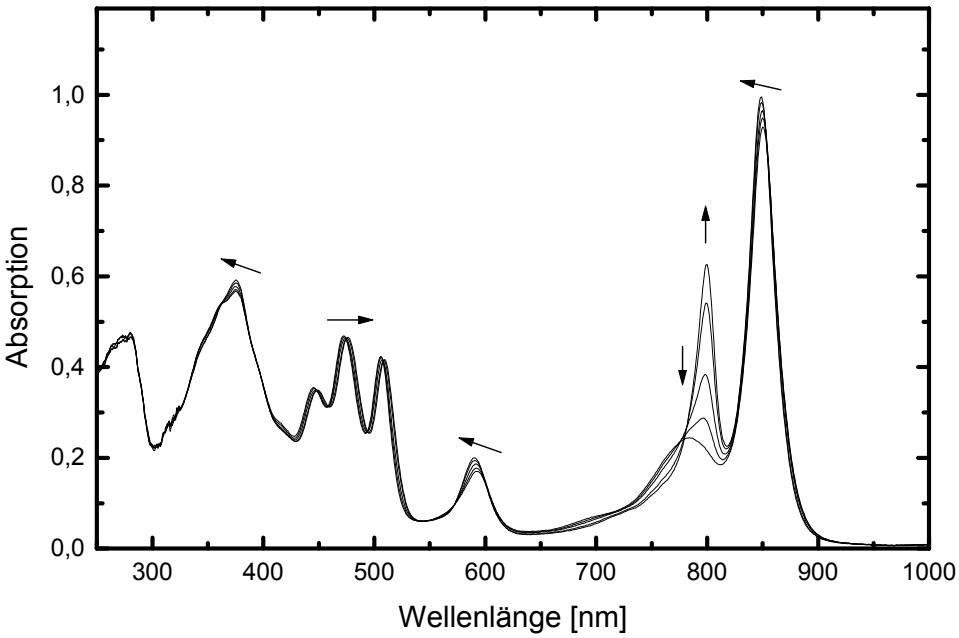


Bild 5-1: Absorption von B800-850 aus *Rb. sphaeroides* nach der Rücktitration von pH=4.3 auf pH=8.0, ohne vorherige Abtrennung des freien Pigmentes. Die Pfeile zeigen die Richtung der Verschiebung und die Veränderung der Absorption mit der Zeit.

Die spektralen Veränderungen, die durch die Säurebehandlung des LH2-Komplexes aus *Rb. sphaeroides* hervorgerufen wurden, sind nahezu vollständig (> 95 %) reversibel. Das Spektrum in Bild 5-1 zeigt die Rücktitration von pH 4.3 auf pH 8.0 mit NaOH, ohne einer vorherigen Abtrennung des durch die Ansäuerung freigewordenen BChls.

5.1.1 Abhängigkeit der BChl-B800 Rekonstitution vom Detergens

Wie in Kapitel 4.1.1 gezeigt wurde, ist die Möglichkeit, das BChl-B800 vollständig, ohne einer gleichzeitig auftretenden Denaturierung, vom LH2-Komplex zu entfernen, unter anderem vom eingesetzten Detergens abhängig. Deshalb wurden auch für die Rekonstitution unterschiedliche Detergentien untersucht. Zum Einsatz kamen allerdings nur solche Detergentien, bei denen der p(850)-Komplex stabil war (Tabelle 5-1).

Detergens	**LH2 aus *Rb. sphaeroides***	**Rekonstitutionsrate [%]**
n-Dodecyl-β-maltosid (DM)	+	≈ 80
Octyl-β-D-glycosid	+	≈ 75
Triton-BG 10	+	≈ 50
CHAPS	+/-	≈ 35

Tabelle 5-1: Vergleich verschiedener Detergentien zur Rekonstitution von BChl in die BChl-B800 Bindungstasche des LH2 aus *Rb. sphaeroides* in Tris-Puffer bei pH = 8.0 und RT. +: BChl lässt sich in die BChl-B800 Bindungstasche einlagern; +/-: BChl lässt sich zwar in die BChl-B800 Bindungstasche einlagern, der Komplex wird aber bei der Aufreinigung nahezu irreversibel an die DEAE-Zellulose gebunden.

Die Rekonstitution mit verschiedenen Detergentien wurde, wie in Kapitel 2.1.3.1 beschrieben, durchgeführt. Nach der Inkubation wurde der entstandene Komplex über DEAE-Zellulose aufgereinigt und anschließend absorptionsspektroskopisch vermessen. Die Rekonstitutionsrate wurde durch das Verhältnis $A_{800/850}$ und die Denaturierungsrate durch die Bestimmung der Komplexmenge vor und nach der Inkubation bestimmt.

Der mit CHAPS erhaltene Komplex wird nahezu irreversibel an die DEAE-Zellulose gebunden. Auch eine sehr hohe Salzkonzentration (600 mM NaCl) und / oder eine Erhöhung der Detergenskonzentration von 10 mM auf 30 mM brachten nur geringen Erfolg. Bei sehr geringen Ausbeuten von etwa 5 % konnte eine Rekonstitutionsrate von etwa 35 % beobachtet werden. Deshalb wurde von einer weiteren Verwendung von CHAPS abgesehen.

Beim Einsatz von Triton-BG10 konnten die Ergebnisse von Bandilla mit maximalen Eintauschraten von etwa 50 % bestätigt werden [Bandilla et al. 1998]. Die Eigenschaften von Triton-BG10 variieren jedoch von Charge zu Charge sehr stark und es sind langwierige und teure Aufreinigungen des Detergens erforderlich, um es für die BChl-Extraktion verwenden zu können. Auch musste bei jeder neuen Aufreinigung oder bei Chargenwechsel die CMC und die optimalen Bedingungen von Triton-BG10 für die Extraktion erneut bestimmt werden und eine daraus resultierende Anpassung der Konzentration erfolgen.

Sowohl mit den DM als auch mit β-OG konnten wesentlich höhere Eintauschraten von knapp 80 % in die BChl-B800 Bindungstasche beobachtet werden. Für die folgenden Experimente wurde DM als Standard verwendet, da der p(850)-Komplex bereits darin solubilisiert ist. Ein weiterer Vorteil von DM ist, dass zum Erreichen einer nahezu vollständigen Rekonstitution kein erneuter Wechsel zu LDAO erfolgen muss [Bandilla et al. 1998].

5.1.2 Einfluss der Antennenkonzentration auf die Rekonstitution

Um eine möglichst hohe Eintauschrate in die B800-Bindungstasche zu erhalten, ist es notwendig, die optimale Antennenkonzentration zu ermitteln (Bild 5-2).

Wie bei der Extraktion des BChl-B800 aus der Bindungstasche (Bild 4-1), ist auch die Eintauschrate von der Antennenkonzentration p(850) abhängig. Bei Konzentrationen zwischen 2.7 und 5.4 µM (OD-Werte zwischen 0.5 und 1.0 cm^{-1}) bleibt die Eintausch-rate nahezu konstant bei etwa 80 %, eine weitere Erhöhung auf einen OD-Wert von 1.3 bewirkt einen Rückgang der Eintauschrate von 75 % auf 70 % und eine Antennen-konzentration von 21.6 µM (OD = 4.0 cm^{1}) ermöglicht nur noch eine Rekonstitutions-rate von 40 %.

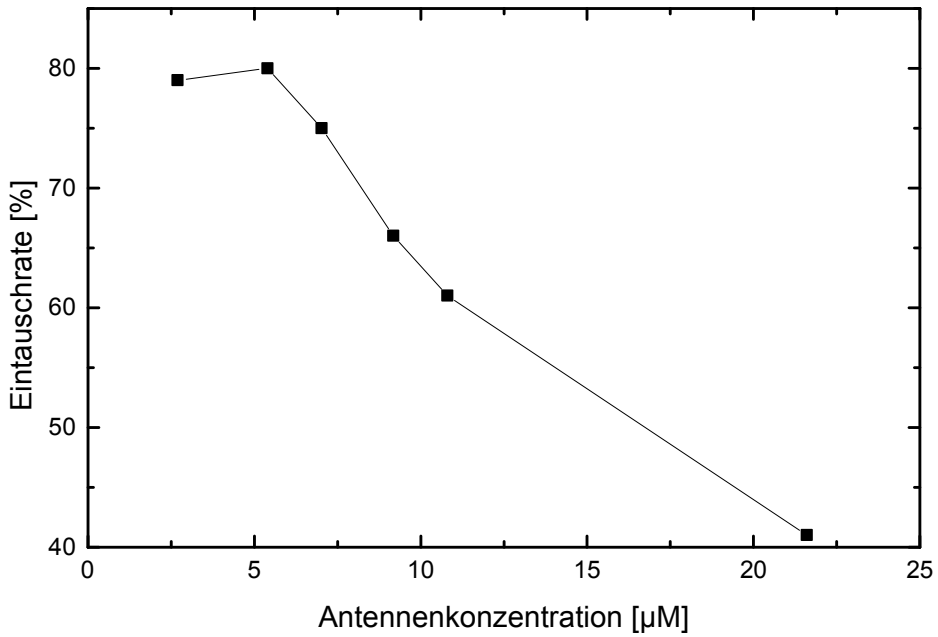


Bild 5-2: Einfluss der Antennenkonzentration auf die Eintauschrate des BChl-B800 in den peripheren Antennenkomplexen aus *Rb. sphaeroides* (—■—) bei RT in DM-Puffer pH = 8.0 bei einem 2 fachem Pigement-Überschuss .

Die für die Versuche am besten geeignete Antennenkonzentration p(850) liegt demnach bei 5.4 µM (OD = 1.0 cm^{-1}).

5.1.3 Einfluss der Pigmentkonzentration auf die Rekonstitution

Die Besetzung der B800-Bindungstasche steigt mit der Erhöhung der Konzentration des extern zugefügten BChl an und erreicht ein Maximum von etwa 90 % bei einem 6-fachen molaren Überschuss des Pigments im Verhältnis zum eingesetzten Antennenkomplex. Bei höheren Pigmentkonzentrationen bleibt die Eintauschrate nahezu gleich (Bild 5-3).

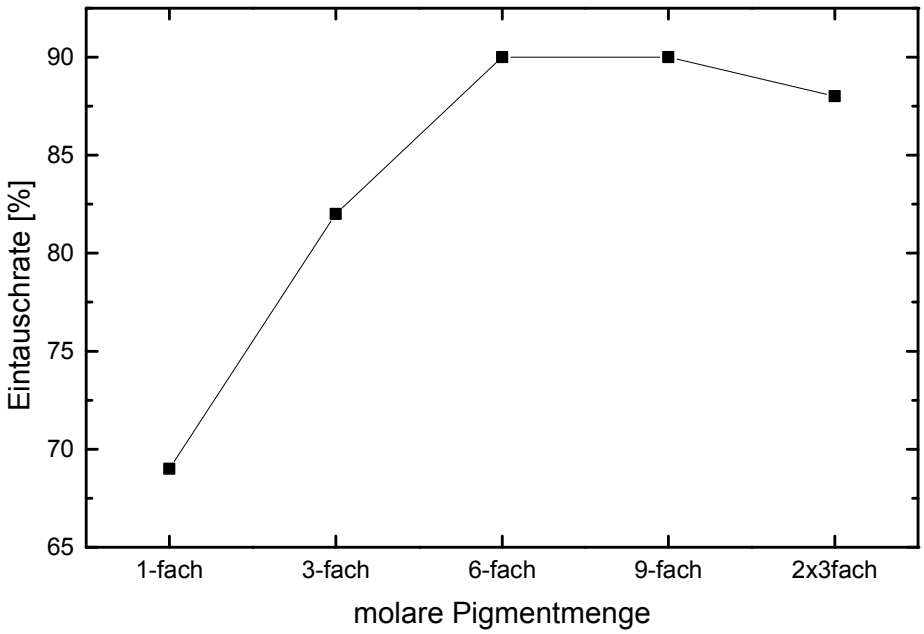


Bild 5-3: Einfluss des molaren Pigmentüberschusses im Verhältnis zur Antennenkonzentration auf die Eintauschrate des BChl-B800 in den Antennenkomplexen p(850) aus *Rb. sphaeroides* (—■—) bei RT in DM-Puffer pH = 8.0 bei einer P(850) Konzentration von 5.4 µM.

Durch eine Wiederholung des Rekonstitutionsexperimentes (Doppelrücktausch) konnte, im Gegensatz zu Arbeiten am bakteriellen RC [Scheer & Struck 1993], keine Steigerung der Eintauschrate beobachtet werden (Bild 5-3).

Die Rekonstitutionsexperimente wurden deshalb mit einem 6-fachen molaren Pigmentüberschuss im Verhältnis zum eingesetzten Antennenkomplex durchgeführt.

5.1.4 Einfluss von Temperatur auf die Rekonstitution

Wie die Extraktion des BChl-B800 ist auch die Rekonstitution temperaturabhängig.

Hierfür wurde der Rekonstitutionsansatz mit einem 6-fachen molaren Überschuss – im Verhältnis zum eingesetzten Antennenkomplex p(850) – an BChl 2 Stunden bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Der Denaturierungsgrad wurde absorptionsspektroskopisch bestimmt, und die entstandenen Komplexe wurden zur Bestimmung der Eintauschrate säulenchromatographisch aufgereinigt (Bild 5-4).

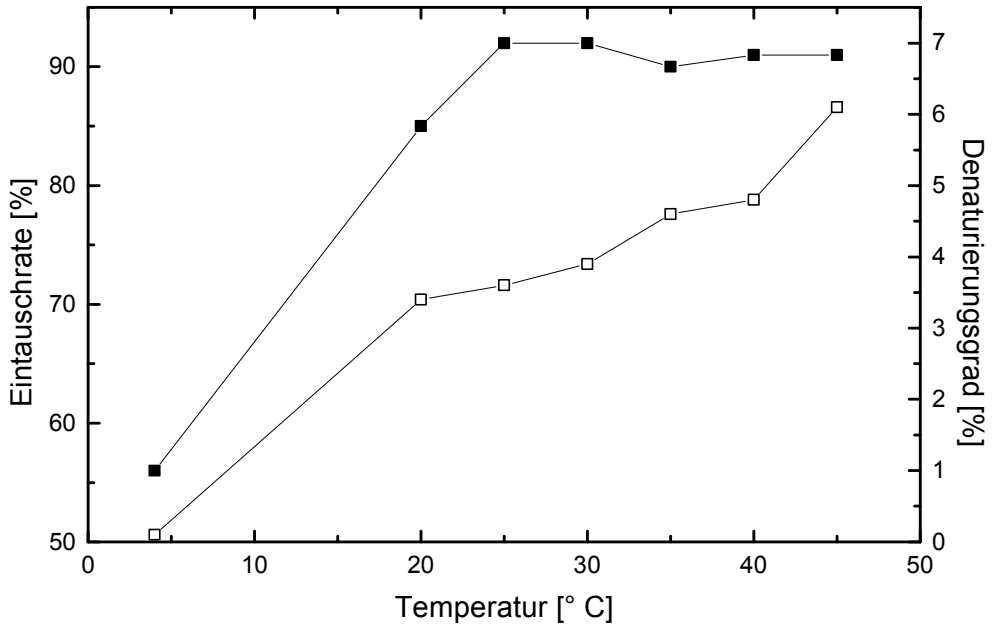


Bild 5-4: Einfluss der Temperatur auf die Eintauschrate und den dadurch verursachten Denaturierungsgrad eines im 6-fachen Überschuss vorliegenden BChl in die BChl-B800 Bindungstasche des peripheren Antennenkomplexes p(850) aus *Rb. sphaeroides* (5.4 µM) in DM-Puffer pH = 8.0. (—■—): Eintauschrate in % für BChl-B800 aus *Rb. sphaeroides* bei einer bestimmten Inkubationstemperatur; (—□—): Denaturierungsgrad in % für die jeweilige Inkubationstemperatur.

Die Eintauschrate steigt von anfänglich 56 % bei 4 °C auf 92 % bei 25 °C an und bleibt dann konstant bei einem Wert von 90 % bei Temperaturen von 30 bis 45 °C. Der Denaturierungsgrad steigt ebenfalls mit Erhöhung der Temperatur an, dabei sind bei 25 °C 3.5 % der Probe denaturiert, während bei 45 °C schon 6 % Denaturierung beobachtet

werden konnten. Berücksichtigt man die Eintauschrate und Denaturierungs-grad, so ist die optimale Temperatur bei 25 °C erreicht, dies wurde für die nach-folgenden Experimente verwendet.

Zusammenfassend sind folgende Bedingungen für die Rekonstitution von p(850) aus *Rb. sphaeroides* mit einem extern zugefügten Pigment optimal und wurden für künftige Experimente verwendet: 20 mM Tris/HCL pH = 8.0 mit 0.06 % DM bei einer Antennenkonzentration von 5.4 µM (OD = 1 cm^{-1}) und einem 6-fachen molaren Überschuss des extern zugefügten Pigments bei einer Inkubationstemperatur von 25 °C.

5.2 Vergleich zwischen nativem LH2 und mit BChl rekonstituierten LH2 aus *Rb. sphaeroides*

5.2.1 Absorptionsspektroskopie

Das Absorptionsspektrum des mit BChl rekonstituierten LH2-Komplexes ist mit dem des nativen Komplexes identisch (vgl. Bild 5-5 und Tabelle 5-2).

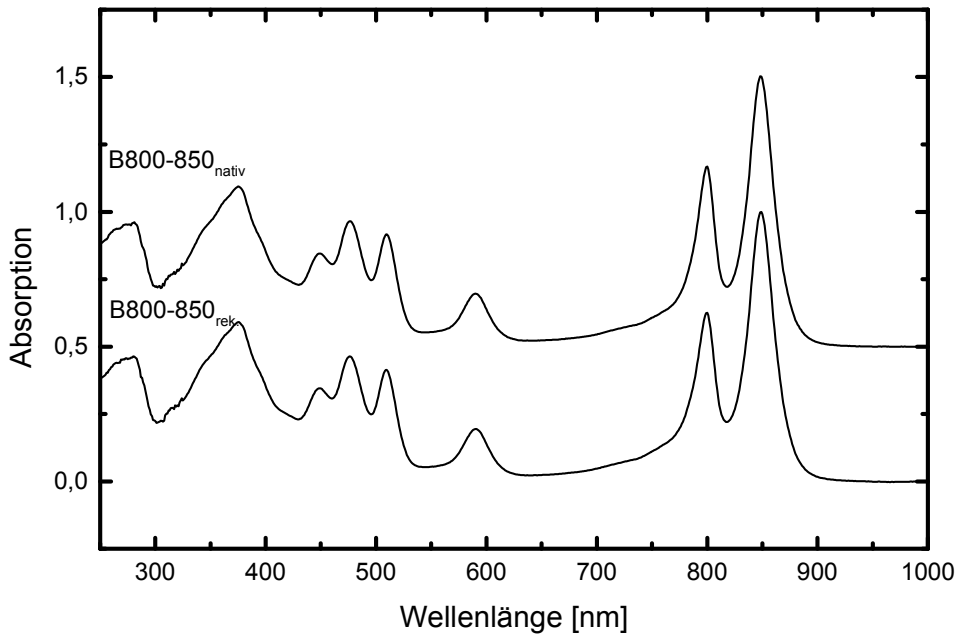


Bild 5-5: Absorptionsspektrum des nativen und des mit BChl rekonstituierten B800-B850 Komplexes aus *Rb. sphaeroides*.

	Wellenlänge [nm]				
	Soret	**Carotinoide**	**Q_x**	**Q_y(B800)**	**Q_y (B850)**
B800-850$_{nativ}$	375	450/478/511	589	798	848
B800-850$_{rek.}$	375	450/478/511	590	798	849

Tabelle 5-2: Die Wellenlängen der Absorptionsmaxima (in nm) des nativen, bzw. mit BChl rekonstituierten LH2-Komplexes aus *Rb. sphaeroides.*

Die Q_y-Absorptionsbande, die dem BChl-B800 (798 nm) zugeordnet wird, konnte durch Rekonstitution in die BChl-B800-Bindungstasche des p(850)-Komplexes mit extern zugeführtem BChl weitgehend wiederhergestellt werden. Vergleicht man die Amplitude dieser Bande mit der des nativen B800-850-Komplexes, so findet man eine durch-schnittliche Besetzung der B800-Bindungstaschen von etwa 90 %. Zusätzlich konnten die durch die Extraktion des BChl-B800 bedingten spektralen Verschiebungen des Komplexes (Blauverschiebung der Carotinoide und Rotverschiebung des BChl Q_x- und Q_y-Banden) durch die Wiederauffüllung der Bindungsstelle im rekonstituierten Komplex rückgängig gemacht werden (Tabelle 5-2). Man detektiert bei der Extraktion des BChls aus der BChl-B800-Bindungstasche keine Banden freier Carotinoide, sondern lediglich eine spektrale Verschiebung. Das Verhältnis von BChl und den Carotinoiden bleibt im Absorptionsspektrum des rekonstituierten Komplexes im Vergleich zum nativen konstant.

Die Reversibilität der Extraktion mit ähnlich guten Besetzungszahlen konnte auch im Anschluss an diese Arbeiten bei *Rps. acidophila* 10050 gezeigt werden [Fraser et al. 1999].

5.2.2 Circulardichroismus

Bei den niedrigen pH-Werten, die zur Extraktion und Rekonstitution des BChl-B800 benötigt werden, ist es prinzipiell möglich, dass diese Vorgänge die Grundstruktur des LH2-Komplexes beeinflussen. Aus diesem Grund ist es wichtig, die quartäre Struktur des Pigment-Protein-Komplexes zu untersuchen. Im nativen LH2-Komplex haben sowohl das BChl als auch die Carotinoide aufgrund ihrer Konformation und des Arrangements innerhalb des Komplexes sehr starke CD-Signale [Cogdell & Scheer 1985]. Vergleicht man das CD-Spektrum des nativen mit dem des rekonstituierten Komplexes, so würden Unterschiede, die man im NIR und im sichtbaren Bereich findet, auf Veränderungen der Pigmentanordnung und / oder Konformation im Protein hinweisen (Bild 5-6; Tabelle 5-3).

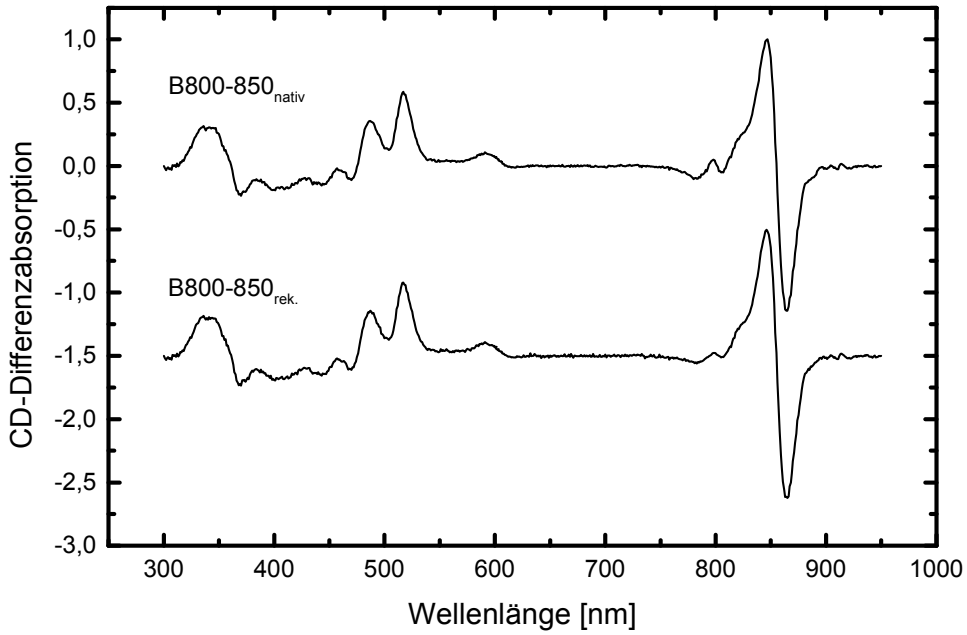


Bild 5-6: CD-Spektrum des nativen und des mit BChl rekonstituierten B800-B850 Komplexes aus *Rb. sphaeroides*, der unter den in Kapitel 5.1 optimierten Bedingungen synthetisiert wurde.

	Wellenlängen [nm]				
	Soret	**Carotinoide**	**Q_x**	**Q_y(B800)**	**Q_y (B850)**
B800-850$_{nativ}$	342(+)/370(-) 385(+)/404(-)	429(+)/458(+)/471(-) 488(+)/519(+)	592(+)	782(-)/806(-)	847(+)/855(0)/ 865(-)
B800-850$_{rek.}$	342(+)/370(-) 385(+)/404(-)	429(+)/459(+)/471(-) 488(+)/519(+)	592(+)	783(-)/807(-)	847(+)/856(0)/ 866(-)

Tabelle 5-3: Die Wellenlängen der CD-Maxima und Minima des nativen, bzw. mit BChl rekonstituierten LH2-Komplexes aus *Rb. sphaeroides*. (+): CD-Maxima, (-) Minima, (0): Schnittpunkt mit der Nulllinie

Die Bandenform des CD-Signals, das dem Q_y-Übergang des BChl-B850 zugeordnet wird (Bereich zwischen 820 und 920 nm), ist im nativen und im rekonstituierten Komplex identisch. Eine positive Bande mit einem Maximum von 847 nm (nativ) entspricht dem des

rekonstituierten Komplexes, wobei sowohl der Nulldurchgang von 855 nm, als auch das Minimum von 865 nm in der rekonstituierten Antenne um jeweils 1 nm gegenüber dem nativen rotverschoben ist.

Ähnliches gilt für die Extrema der Q_y-Bande des BChl-B800. Die Lage der Minima im rekonstituierten Komplex sind ebenso um 1 nm von 782 und 806 nm im nativen auf 783 und 807 nm rotverschoben. Das dem Q_x-Übergang des BChl entsprechende Signal mit einem Maximum bei 592 nm ist in der nativen und in der rekonstituierten Antenne in Form und Lage identisch. Ebenso sind die dem Soret-Übergang zugeordneten Signale zwischen 300 und 450 nm, sowohl in der Lage der Extrema mit positiven Maxima bei 342 und 385 nm und negativen Minima bei 370 und 404 nm, als auch in deren Feinstruktur gleich. Im nativen Komplex ist das CD-Signal, das für den Soret-Bereich (300 - 450 nm) verantwortlich ist, sehr definiert mit positiven Extremwerten bei 342 und 385 nm und negativen bei 370 und 404 nm. Im rekonstituierten Komplex liegen sie bei den gleichen Wellenlängen.

Das CD-Signal, das den Carotinoiden zugeordnet wird (Bereich zwischen 450 –550 nm) hat in beiden Komplexen das gleiche Aussehen (Bild 5-6). Im nativen und im rekonstituierten Komplex besitzt das Signal positive Extrema bei 429 und 458 nm (nativ) bzw. 459 nm (rekonstituiert), 488 und 519 nm und negative bei 471 nm.

Zusammenfassend konnten auch die durch die Extraktion des BChl-B800 hervorgerufenen Veränderungen im CD-Spektrum, wie die Blauverschiebung der Carotinoide und die Rotverschiebung der Soret- Q_x- und Q_y-Bande des BChl (vgl. Bild 5-6 und Tabelle 5-3 mit Bild 4-7 und Tabelle 4-7), durch das Auffüllen der BChl-B800-Bindungstaschen wieder rückgängig gemacht werden.

5.2.3 Fluoreszenz

Um zu testen, ob das BChl-B800-Molekül im rekonstituierten Komplex funktional gebunden ist und damit effizient am B800 $\rightarrow$ B850 Energietransfer beteiligt ist, wurden zusätzlich Fluoreszenzmessungen durchgeführt (Bild 5-7; Tabelle 5-4). Dazu wurde die Quantenausbeute der Fluoreszenz von BChl-B800 auf die BChl-B850 Molekülen durch Anregung in der blauen Flanke der Q_y-Bande des nativen Komplexes mit dem rekonstituierten verglichen. Ist es für die BChl-B800-Moleküle nur teilweise möglich, Anregungsenergie zum BChl-B800 zu transportieren, und wird diese nicht anderweitig gelöscht, dann erscheint die Fluoreszenz direkt von den BChl-B800 Molekülen, anderenfalls kommt die Fluoreszenz vom BChl-B850. Die relativen Beiträge der Fluoreszenz-Emission des BChl-B800 und BChl-B850 sind somit eine sensible Methode, die energetische Kopplung zwischen beiden zu testen.

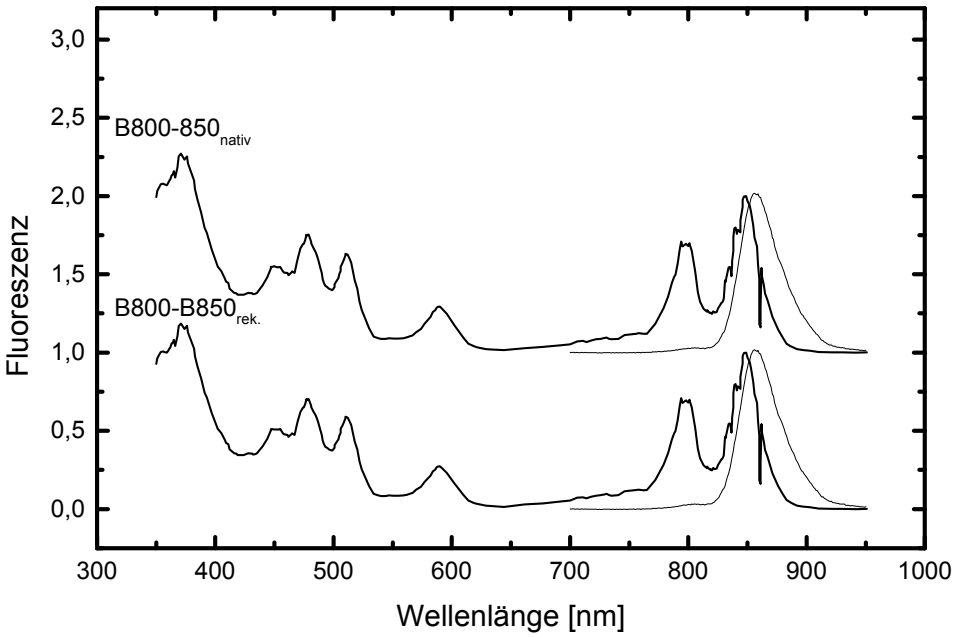


Bild 5-7: Fluoreszenz-Anregungs- und Emissionsspektren des nativen und des mit BChl rekonstituierten B800-B850-Komplexes aus *Rb. sphaeroides*; dicke Linien: Anregung bei 858 nm; dünne Linie: Emission bei 785 nm

	Emission [nm]
B800-850$_{nativ}$	858
B800-850$_{rek.}$	859

Tabelle 5-4: Charakteristische Fluoreszenz-Emissionsbanden (angeregt bei 785 nm) des nativen bzw. rekonstituierten LH2-Komplexen aus *Rb. sphaeroides*

Die Banden des Fluoreszenz-Anregungsspektrums des nativen bzw. rekonstituierten B800-850-Komplexes entsprechen nach Lage und Intensität denen des jeweiligen Absorptionsspektrums (Bild 5-7 dicke Linien). Deshalb kann man davon ausgehen, dass der Energietransfer von den Carotinoiden und den BChl-B800 auf die BChl-B850 mit einer sehr hohen Quantenausbeuten ϕ_{EET} sowohl vom nativen als auch vom rekonstituierten Komplex stattfindet. Dabei sind die Quantenausbeuten des rekonstituierten Komplexes mit denen des nativen vergleichbar.

Bild 5-7 (dünne Linien) und Tabelle 5-4 zeigt die Fluoreszenz-Emissionsbanden des nativen und des rekonstituierten B800-850-Komplexes. Die Emissions-Bande findet sich im nativen

Komplex bei 858 nm und in der rekonstituierten Antenne bei 859 nm. Dies entspricht einem Stokes-Shift von jeweils 10 nm. Die Emissions-Bande bei 805 nm ist im rekonstituierten Komplex im Gegensatz zum p(850) wieder in vergleich-barer Intensität detektierbar (siehe Kapitel 3.3.3). Dies spricht auch für eine erfolgreiche Rekonstitution, da der in der nativen Antenne gut funktionierende Energietransfer auch in der rekonstituierten quantitativ wiederhergestellt ist.

5.2.4 HPLC

Die Pigmentzusammensetzung der nativen und rekonstituierten Antennen wurde haupt-sächlich absorptionsspektroskopisch (Bild 5-5) ermittelt. Die so erhaltenen Mengen an BChl der rekonstituierten Antenne wurden mit Hilfe der HPLC-Analyse (Bild 5-8; Tabelle 5-5) überprüft und quantifiziert.

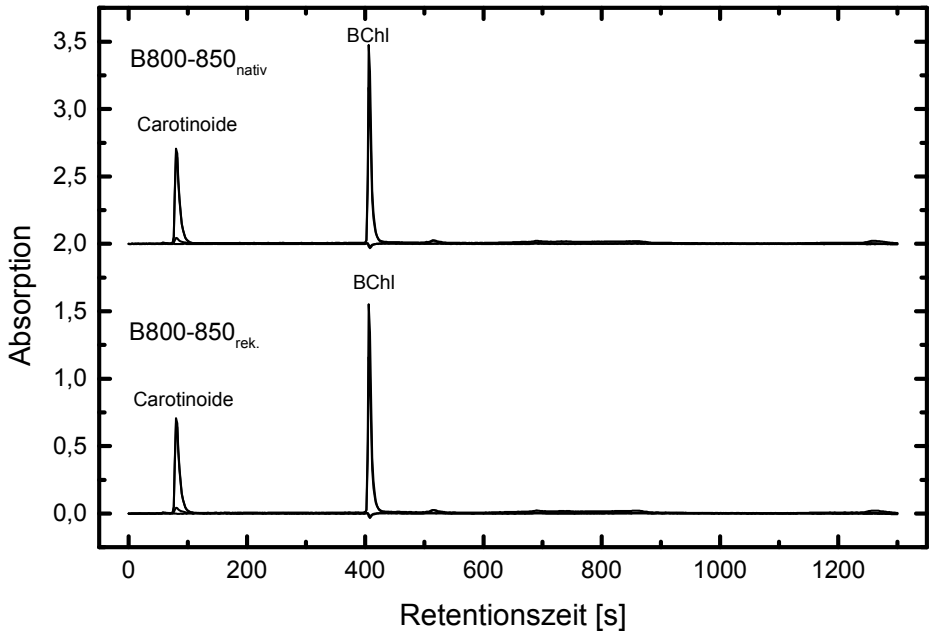


Bild 5-8: HPLC-Analyse des MeOH-Extraktes des nativen und des mit BChl rekonstituierten des LH2-Komplexes aus *Rb. sphaeroides*, genormt auf die Carotinoide; Detektiert wurde bei den Wellenlängen: 520 nm (Spheroiden und Spheroidenon); 780 nm (BChl)

	Retentionszeit BChl [s]	∫Spheroidenon : ∫BChl
B800-850$_{nativ}$	406	1 : 1.59
B800-850$_{rek.}$	408	1 : 1.43

Tabelle 5-5: Retentionszeiten in Sekunden der nativen und des mit BChl rekonstituierten Komplexes aus *Rb. sphaeroides* isolierten Pigmente, und das Verhältnis des Integrals über die Spheroidenon zu dem Integral über die BChl-Bande.

Da die exakten Extinktionskoeffizienten im Laufmittelgemisch nicht bekannt sind und die spektrale Analyse der beiden Komplexe zeigt, dass während der BChl-B800- Extraktion und der anschließenden BChl-Rekonstitution der Carotinoidgehalt der Antennenformen nicht verändert wird, wurde das Integral über BChl ins Verhältnis zur Summe der Integrale über die Carotinoide gesetzt. Dabei wurde die Summe der Integrale über die Carotinoide gleich 1 gesetzt.

Die Pigment-Analyse mit Hilfe der HPLC ergab für den mit BChl rekonstituierten LH2-Komplex einen BChl-Gehalt von 1.43 pro Carotinoid. Bei den nativen Komplexen konnte 1.59 BChl pro Carotinoid detektiert werden (Bild 5-8; Tabelle 5-5) (Diese Werte sind Durchschnittswerte, sie wurden durch jeweils drei analoge Ansätze bestimmt.). Dies entspricht in etwa einer BChl-Abnahme nach einer erfolgreichen Rekonstitution von etwa 10 %. Diese Abnahme bedeutet, dass statt 3 BChl nur 2.7 BChl gebunden sind. Bei 2 BChl-B850 gibt das 0.7 BChl-B800, d.h. die Eintauschrate des BChl in die BChl-B800-Bindungstasche liegt somit bei etwa 70 %. Dieser Wert ist deutlich geringer als die spektroskopisch ermittelte Eintauschrate. Dieser Unterschied in der HPLC ermittelten Austauschrate im Vergleich zur Bestimmung mittels Absorption lässt sich durch eine geänderte Carotinoidzusammensetzung erklären. Bandilla [Bandilla 1995] stellte bei den Rekonstitutionsexperimenten einen reduzierten Spheroidenonanteil fest, wobei diese Zusammensetzung in einem Bereich von ± 10 – 15 % sehr stark schwankte. Deshalb wurde für die Bestimmung der Eintauschrate mit modifizierten Pigmenten der absorptionsspektroskopisch ermittelte Wert verwendet.

5.2.5 SDS-PAGE

Die Protein-Zusammensetzung wurde mit Hilfe denaturierender Polyacrylamidgele (SDS-PAGE) überprüft. Die native wie auch die rekonstituierte Antenne zeigen eine unveränderte Proteinzusammensetzung mit zwei Polypeptid-Untereinheiten α und β (Bild 5-9). Das Molekulargewicht von α beträgt 6 kDa und von β 4.5 kDa.

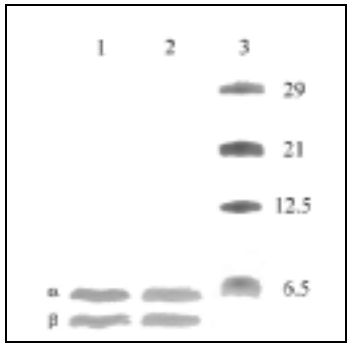


Bild 5-9 SDS-PAGE der α und β–Polypeptide aus dem nativen und dem mit BChl rekonstituierten B800-850-Komplexe aus *Rb. sphaeroides*. Reihe 1: B800-850 nativ; Reihe 2: B800-850 rekonstituiert; Reihe 3: Proteinmarker

5.3 Rekonstitution von BChl in LH2-Komplexe aus *Rps. acidophila*

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Cogdell wurde die Methode der Rekonstitution auf die peripheren Antennen aus *Rps. acidophila* übertragen. Um eine einheitliche Besetzung der BChl-B800-Bindungstasche zu erhalten, wurde auch hier als Ausgangsprodukt der aufgereinigte p(850)-Komplex aus *Rps. acidophila 10050* bzw. der p(820)-Komplex aus *Rps. acidophila* 7750 (s. Kapitel 4.3) verwendet.

5.3.1 Optimierung der Rekonstitution von BChl in LH2 aus *Rps. acidophila*

Für die Rekonstitution mit BChl in die BChl-B800-Bindungstasche der Antennen-komplexe aus *Rps. acidophila* 10050 bzw. 7750 wurden, genau wie bei den Antennen aus *Rb. sphaeroides,* Optimierungsversuche bezüglich der Art des Detergens, Antennen- und

Pigmentkonzentration sowie Temperatur durchgeführt (s. Kapitel 5.1). Die Ergebnisse werden im folgenden kurz zusammengefasst:

Die Rekonstitution für die Antennen aus *Rps. acidophila* 10050 und 7750 wurde mit den Detergentien CHAPS, Triton-BG 10, n-Dodecyl-β-maltosid (DM) Octyl-*β-D*-glycosid (OG) getestet (s. Kapitel 2.1.3.1). Nach der Inkubation erfolgte eine chromatographische Aufreinigung der Komplexe über DEAE-Zellulose. Die Rekonstitutionsrate wurde absorptionsspektroskopisch bestimmt.

Die mit CHAPS entstandenen Komplexe wurden, wie schon der rekonstituierte Komplex aus *Rb. sphaeroides*, irreversibel an die DEAE-Zellulose gebunden, so dass CHAPS nicht weiter verwendet wurde. Mit Triton-BG 10 konnten maximale Eintausch-raten von etwa 50 % beobachtet werden. Durch die Solubilisierung mit DM und mit OG konnte eine Besetzung der B800-BChl-Bindungstasche von etwa 80 % erreicht werden, so dass auch hier, wie bei *Rb. sphaeroides*, in allen nachfolgenden Experimenten DM als Detergens Verwendung fand.

Die Besetzung der BChl-B800-Bindungstasche konnte durch Erhöhung der zugesetzten BChl-Konzentration gesteigert werden, wobei eine maximale Besetzung von ca. 80 % erreicht werden konnte. Die optimale BChl-Konzentration lag bei einem 3-fach molaren Überschuss. Wird die Konzentrationen weiter erhöht, so nimmt die Besetzungsrate wieder ab (s. Kapitel 5.1.3), was an der nichtspezifischen Aggregation der BChl- Moleküle in Lösung liegen könnte, die den Einbau in die leere BChl-B800 Bindungs-tasche verhindert. Ein ähnlicher Effekt konnte auch bei der Rekonstitution von Pigmenten in bakterielle RCs beobachtet werden (Scheer & Struck 1993).

Der Rekonstitutionsansatz, versetzt mit einem 3-fachen Überschuss an externem BChl wurde zwei Stunden bei RT (22 °C), 30 °C und 40 °C inkubiert. Die entstandenen Komplexe wurden absorptionsspektroskopisch überprüft. Eine Eintauschrate von etwa 80 % konnte bei allen Temperaturen detektiert werden, wobei bereits ab 30 °C eine erhöhte Denaturierungsrate beobachtet wurde, die bei 40 °C 15 % höher liegt als bei RT.

Zusammengefasst ergeben sich folgende Bedingungen für eine erfolgreiche Rekonstitution von extern zugeführtem BChl in die BChl-B800-Bindungstasche des p(820) bzw. p(850) aus *Rps. acidophila*: Zweistündige Inkubation des p(820)- bzw. p(850)-Komplexes in Anwesenheit eines 3-fachen Überschusses an BChl in Tris-DM-Puffer pH 8 bei RT.

5.3.2 Vergleich zwischen nativen und den mit BChl rekonstituierten LH2 aus *Rps. acidophila*

Die Absorptionsspektren der mit BChl rekonstituierten peripheren Antennen aus *Rps. acidophila* 7750 (Bild 5-10 und Tabelle 5-6) und 10050 (Bild 5-11 und Tabelle 5-7) zeigen nahezu die gleichen Eigenschaften und Verschiebungen wie die der nativen Komplexe.

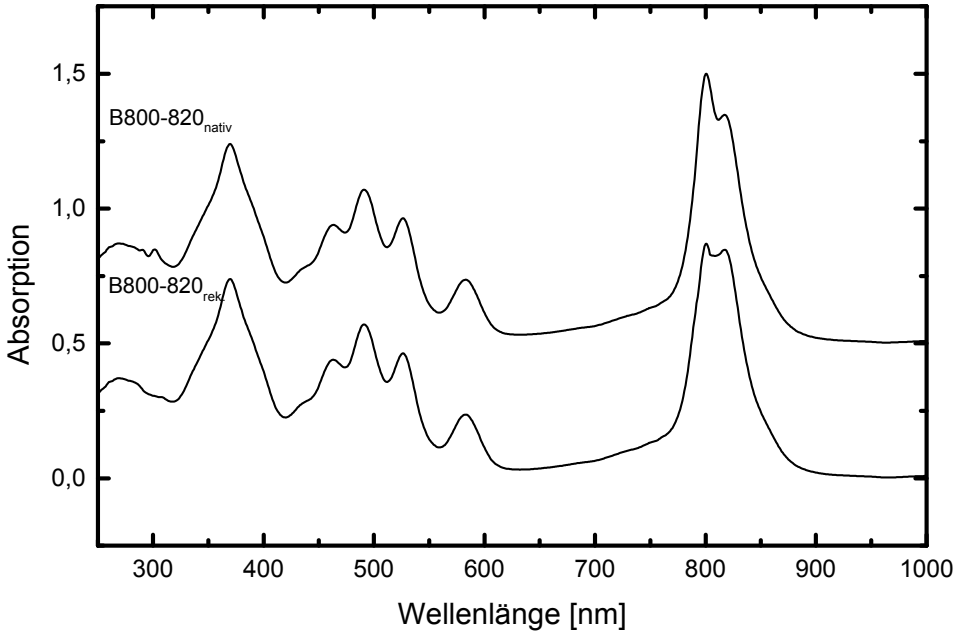


Bild 5-10: Absorptionsspektren des nativen ($B800\text{-}820_{nativ}$) und des mit BChl rekonstituierten ($B800\text{-}820_{rek.}$) B800-B820-Komplexes aus *Rps. acidophila* 7750.

	Wellenlängen [nm]				
	Soret	**Carotinoide**	**Q_x**	**Q_y(B800)**	**Q_y (B820)**
$B800\text{-}820_{nativ}$	370	463/491/526	583	801	817
$B800\text{-}820_{rek.}$	370	463/491/526	584	801	818

Tabelle 5-6: Die Wellenlängen der Absorptionsmaxima [nm] des nativen ($B800\text{-}820_{nativ}$), bzw. mit BChl rekonstituierten ($B800\text{-}820_{rek.}$) LH2-Komplexes aus *Rps. acidophila* 7750.

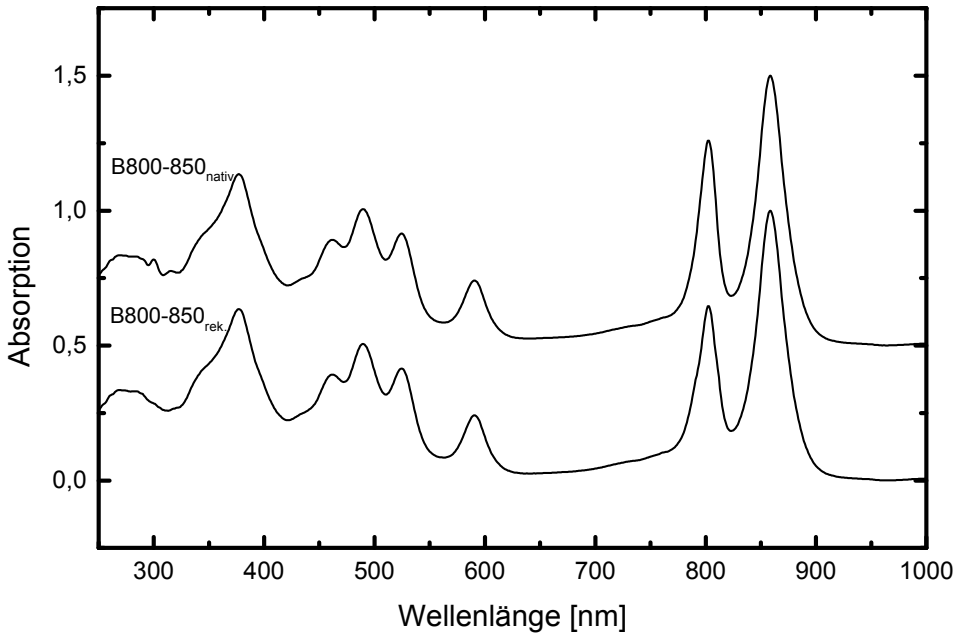


Bild 5-11: Absorptionsspektren des nativen (B800-850$_{nativ}$) und des mit BChl rekonstituierten (B800-850$_{rek.}$) B800-B850-Komplexes aus *Rps. acidophila* 10050.

	Wellenlängen [nm]				
	Soret	**Carotinoide**	**Q_x**	**Q_y(B800)**	**Q_y (B850)**
B800-850$_{nativ}$	377	461/490/524	590	802	858
B800-850$_{rek}$	377	461/490/524	591	802	859

Tabelle 5-7: Die Wellenlängen der Absorptionsmaxima [nm] des nativen (B800-850$_{nativ}$), bzw. mit BChl rekonstituierten (B800-850$_{rek.}$) LH2-Komplexes aus *Rps. acidophila* 10050.

Die spektralen Veränderungen, die durch die Extraktion der BChl-B800 bewirkt wurden, sind durch die Besetzung dieser Bindungstasche wieder rückgängig gemacht worden. Der durch das Entfernen des BChl-B800 verursachte Verlust der Q_y-Absorptionsbande bei etwa 800 nm konnte in beiden Antennenkomplexen aus *Rps. acidophila* durch Rekonstitution mit BChl wiederhergestellt werden. Die Blauverschiebungen der Carotinoid-Absorptionen sowie die Rotverschiebungen der BChl Q_x- und Q_y- Übergänge sind in den rekonstituierten Antennen nicht mehr zu finden (vgl. Tabelle 4-6 und Tabelle 4-7). Die Absorptionsmaxima weisen wieder die Werte des nativen Komplexes

auf. Vergleicht man die Intensitäten der Absorptionsbanden der rekonstituierten mit denen der nativen Komplexe, so kann daraus eine Besetzung der BChl-B800-Bindungstasche von etwa 80 % abgeleitet werden.

Diese Reversibilität und die funktionelle Besetzung der BChl-B800-Bindungstasche mit BChl zeigt sich auch in dem Vergleich der CD-Spektren des nativen und rekonstituierten Komplexes aus den beiden *Rps. acidophila*-Stämmen (Bild 5-12 und Bild 5-13, sowie Tabelle 5-8 und Tabelle 5-9).

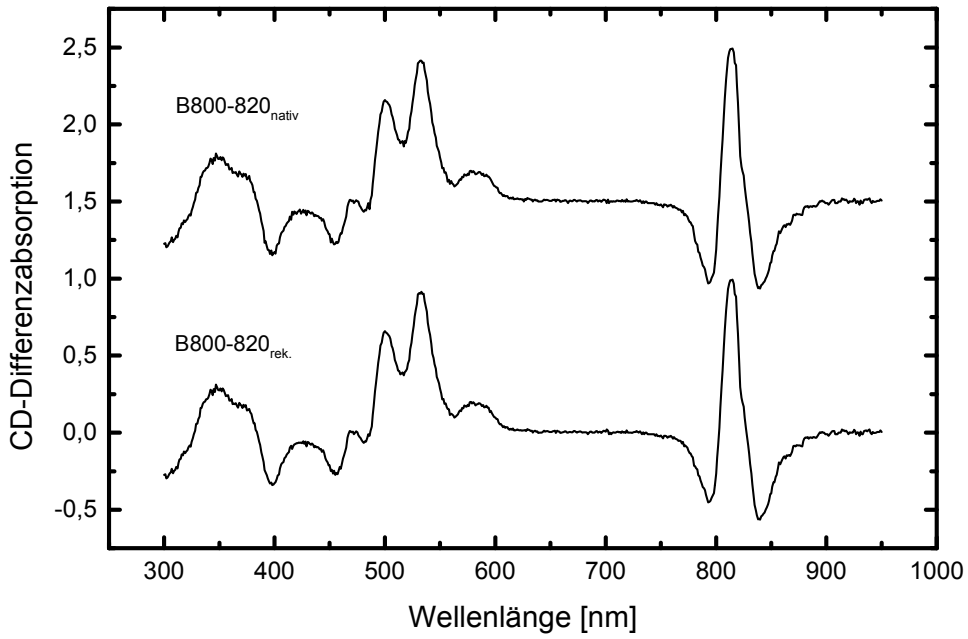


Bild 5-12: CD-Spektren des nativen ($B800\text{-}820_{nativ}$) und des mit BChl rekonstituierten ($B800\text{-}820_{rek.}$) B800-B820-Komplexes aus *Rps. acidophila* 7750.

	Wellenlängen [nm]				
	Soret	**Carotinoide**	**Q_x**	**Q_y(B800)**	**Q_y (B850)**
B800-820$_{nativ}$	352(+)/374(+) 398(-)	456(-)/483(-) 501(+)/533(+)	583(+)	792(-)	814(+)/828(0) 841(-)
B800-820$_{rek.}$	352(+)/374(+) 398(-)	456(-)/482(-) 501(+)/533(+)	584(+)	792(-)	815(+)/829(0) 842(-)

Tabelle 5-8: Die Wellenlängen der CD-Maxima und Minima des nativen, bzw. mit BChl rekonstituierten LH2-Komplexes aus *Rps. acidophila* 7750. (+): CD-Maxima, (-) Minima, (0): Schnittpunkt mit der Nulllinie.

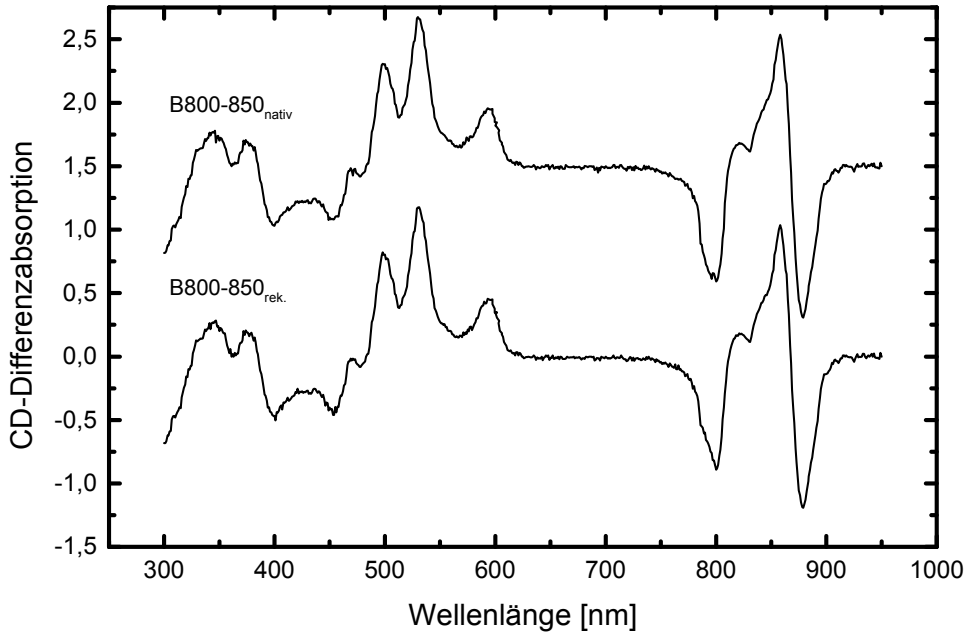


Bild 5-13: CD-Spektren des nativen (B800-850$_{nativ}$) und des mit BChl rekonstituierten (B800-B850$_{rek.}$) des LH2-Komplexes aus *Rps. acidophila* 10050.

	Wellenlängen [nm]				
	Soret	**Carotinoide**	**Q_x**	**Q_y(B800)**	**Q_y (B850)**
B800-850$_{nativ}$	344(+)/378(+)/401(-) 365(-) 432(+)	456(-)/471(+)/480(-) 500(+)/532(+)	595(+)	802(-)	858(+)/869(0) 880(-)
B800-850$_{rek}$	344(+)/378(+)/401(-) 365(-) 432(+)	456(-)/470(+)/480(-) 500(+)/532(+)	596(+)	802(-)	859(+)/870(0) 881(-)

Tabelle 5-9: Die Wellenlängen der CD-Maxima und Minima des nativen, bzw. mit BChl rekonstituierten LH2-Komplexes aus *Rps. acidophila* 10050. (+): CD-Maxima, (-) Minima, (0): Schnittpunkt mit der Nulllinie

Die Blauverschiebungen der Carotinoid-Absorptionen sowie die Rotverschiebungen der BChl Q_x- und Q_y- Übergänge sind in den rekonstituierten Antennen nicht mehr zu finden.

Die Lagen und Bandenformen im NIR der nativen und der mit BChl rekonstituierten *Rps. acidophila* Antennenkomplexe stimmen nahezu überein. Die durch die Extraktion des BChl-B800 verursachten Verluste der Bande bei 792 nm (*Rps. acidophila* 7750; Bild 5-12; Tabelle 5-8) bzw. 802 nm (*Rps. acidophila* 10050; Bild 5-13 und Tabelle 5-9) sind im rekonstituierten Komplex wiederhergestellt. Die Blauverschiebungen im Bereich der Carotinoide (Bereich zwischen 450 – 540 nm) und die Rotverschiebungen der Q_x-(Bereich zwischen 580 – 600 nm) und Q_y-Banden des BChl-850 Übergangs (Bereich zwischen 810 und 885 nm) sind in den rekonstituierten Antennen nicht mehr zu beobachten. Auch die definierte Struktur im Soret-Bereich (340 – 435 nm) der nativen Komplexe, die durch die Entfernung der BChl-B800 aufgelöst wurde, ist in den rekonstituierten LH2-Komplexen wiederhergestellt.

Um zu testen, ob das BChl-B800-Molekül im rekonstituierten Komplex funktional gebunden ist und damit effizient am B800 $\rightarrow$ B850 Energietransfer beteiligt ist, wurden mit beiden Antennenformen aus *Rps. acidophila* Fluoreszenzmessungen durchgeführt (Bild 5-14 und Bild 5-15).

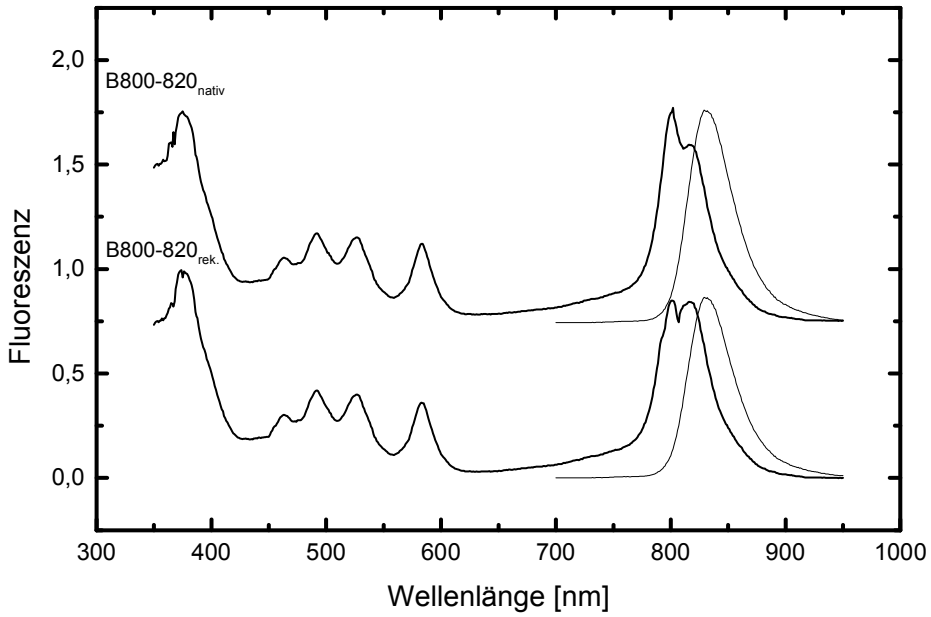


Bild 5-14: Fluoreszenz-Anregungs- und Emissionsspektrum des nativen (B800-820_{nativ}) und des mit BChl (B800-$820_{rek.}$) rekonstituierten B800-B820-Komplexes aus *Rps. acidophila* 7750. dicke Linien: Anregung bei 833 nm; dünne Linie: Emission bei 785 nm:

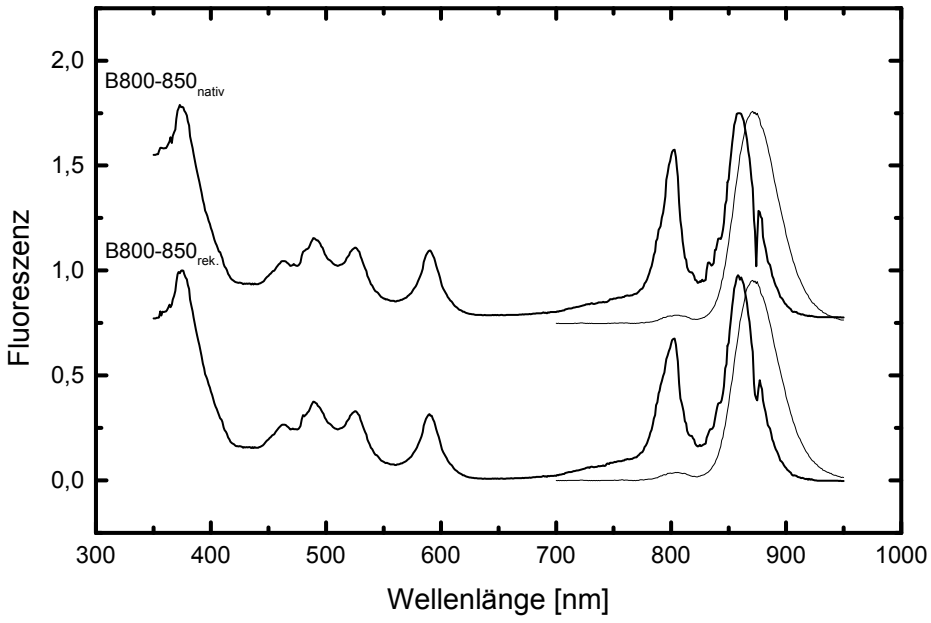


Bild 5-15: Fluoreszenz-Anregungs- und Emissionsspektrum des nativen (B800-850_{nativ}) und des mit BChl (B800-$850_{rek.}$) rekonstituierten B800-B820-Komplexes aus *Rps. acidophila* 10050. dicke Linien: Anregung bei 875 nm; dünne Linie: Emission bei 785 nm.

Die Spektren beider *Rps. acidophila* Komplexe besitzen sowohl im nativen als auch im rekonstituierten LH2 eine Emissionsbande bei 833 nm (*Rps. acidophila* 7750) bzw. 875 nm (*Rps. acidophila* 10050) (Bild 5-14 und Bild 5-15). In beiden Komplexen wird die Anregungsenergie, die von den BChl-B800-Molekülen absorbiert wird, als Fluoreszenz durch BChl-B850 emittiert. Dies zeigt, dass der B800 → B850 Energie-transfer im rekonstituierten Komplex wieder hergestellt ist und mit dem des nativen vergleichbar ist. Zusätzlich ist im rekonstituierten LH2-Komplex aus *Rps. acidophila* 10050 die Emissionsbande bei 805 nm, wie er auch in der nativen Antenne beobachtet werden kann, wieder zu sehen, die der Fluoreszenz des BChl-B800 zugeordnet wird. Bei dem Spike bei ca. 860 nm handelt es sich um ein Artefakt.

5.4 Rekonstitution mit modifizierten Pigmenten

Das Ausgangsprodukt für die Rekonstitution der peripheren Antenne (B800-850) aus *Rb. sphaeroides* mit modifizierten Pigmenten ist der aufgereinigte, BChl-B800-freie p(850)-Komplex (Kapitel 4.2). Die Reaktionsbedingungen waren, wie sie in Kapitel 5.1 bestimmt wurden, d.h. das modifizierte Pigment wird im 6-fachen molaren Überschuss in soviel Methanol gelöst, dass es nach Zugabe in den Rekonstitutionsansatz eine End-konzentration von 10 % des Volumens hat. Die Inkubationstemperatur betrug 25 °C.

5.4.1 Pigmentauswahl

Für die Rekonstitution in die B800-Bindungstasche des LH2-Komlexes aus *Rb. sphaeroides* wurden modifizierte (Bakterio)-Chlorophylle ausgewählt, die eine Reihe von Bedingungen erfüllen müssen:

- Sie sollten leicht in ausreichender Menge herstellbar bzw. isolierbar sein.
- Es sollten möglichst unterschiedliche Positionen im Pigment modifiziert sein, um die Struktur und Selektiviät der Bindungstasche zu überprüfen.
- Sie sollten sich andererseits deutlich in ihren spektralen und / oder (photo)-physikalischen Eigenschaften von den nativen Chromophoren unterscheiden, um eine Änderung der LH2-Eigenschaften bewirken zu können.

In Bild 5-16 und Tabelle 5-10 sind die Pigmente aufgeführt, die diesen Anforderungen entsprechen:

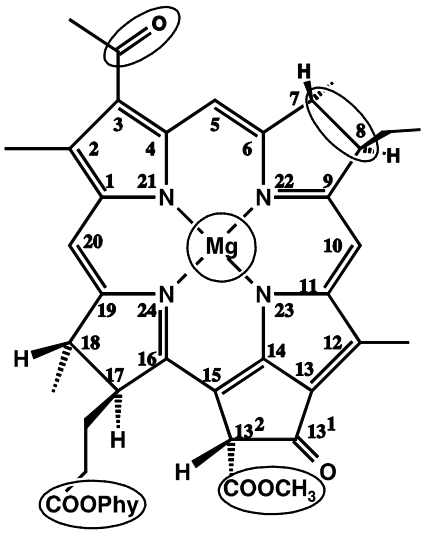


Bild 5-16: Strukturformel von BChl; die modifizierbaren Stellen sind durch Kreise bzw. Ellipsen gekennzeichnet

Pigment	**C-3**	**C-7/8**	**C-13^2**	**C-17^4**	**Zentral-atom**
BChl	Acetyl	dihydro	$COOCH_3$/H	Phytol	Mg^{2+}
$BChl_{gg}$	Acetyl	dihydro	$COOCH_3$/H	Geranylgeraniol	Mg^{2+}
$BChl_{me}$	Acetyl	dihydro	$COOCH_3$/H	Methanol	Mg^{2+}
BChlid	Acetyl	dihydro	$COOCH_3$/H	freie Säure	Mg^{2+}
[3^1-OH]-BChl	hydroxyethyl	dihydro	$COOCH_3$/H	Phytol	Mg^{2+}
[3-Vinyl]-BChl	Vinyl	dihydro	$COOCH_3$/H	Phytol	Mg^{2+}
Chl	Vinyl	Doppelbindung	$COOCH_3$/H	Phytol	Mg^{2+}
[3-Acetyl]-Chl	Acetyl	Doppelbindung	$COOCH_3$/H	Phytol	Mg^{2+}
pyro-BChl	Acetyl	dihydro	H/H	Phytol	Mg^{2+}
[13^2-OH]-BChl	Acetyl	dihydro	$COOCH_3$/OH	Phytol	Mg^{2+}
BPhe	Acetyl	dihydro	$COOCH_3$/H	Phytol	$2H^+$
Zn-BPhe	Acetyl	dihydro	$COOCH_3$/H	Phytol	Zn^{2+}
Phe	Vinyl	dihydro	$COOCH_3$/H	Phytol	$2H^+$

Tabelle 5-10: Struktur und Abkürzungen der nativen oder modifizierten und für Austauschversuche verwendeten (Bakterio)-Chlorine.

Da ein Austausch nicht nur an den äußeren Bedingungen, sondern auch an den spezifischen Eigenschaften eines Pigments scheitern kann, ist es notwendig, mit mehreren sterisch und elektronisch unterschiedlichen Pigmenten zu arbeiten. Dazu fanden eine Reihe von Pigmenten mit veränderten Seitengruppen an den Positionen C-3, C-7-8, C-13^2 und C-17^4 und mit veränderter elektronischer Struktur wie den Chlorinen Verwendung. Desweiteren wurde mit entmetallierten Pigmenten, den (Bakterio)-Pheophytinen gearbeitet (Bild 5-16 und Tabelle 5-10).

Die Chlorine wurden vor allem wegen ihrer kurzwelligen Q_y-Absorption von ca. 679 nm ausgewählt; sie sind auch ohne langwierige Analyse sofort im Absorptions-spektrum erkennbar. Bandilla konnte zeigen, dass eine Modifikation des Zentralatoms (von Mg zu Zn) oder eine Änderung an Position 3 den Austausch kaum beeinflusst, wohingegen Modifikationen am isocyclischen Ring eine für das Gelingen der Rekonstitution entscheidende Rolle spielen [Bandilla et al. 1998].

5.4.2 Nachweis einer Rekonstitution

Folgende Kriterien wurden nach einer Rekonstitution mit modifizierten Pigmenten zur Beurteilung des Experiments herangezogen:

- Die Carotinoid-, Q_x- und Q_y-Banden sollten nach einer erfolgreichen Rekonstitution die für die jeweilige Antennenform typischen spektralen Verschiebungen des nativen Komplexes aufweisen (Tabelle 3-1).

- Die Absorptionsbanden der funktional gebundenen modifizierten Pigmente sollten verglichen mit denen der freien Pigmente im Puffersystem, eine Rot-verschiebung, den sogenannten EIRS (environment-induced red shift), zeigen.

- Der Energie-Transfer zwischen dem modifizierten Pigment und dem BChl-B850 sollte im Anregungs- und Emissionsspektrum erkennbar sein.

- Das modifizierte Pigment sollte nach der funktionellen Integration in die Antenne vor Photooxidation geschützt sein.

5.4.3 Rekonstitution mit [3^1-OH]-BChl

Die 3-Acetyl-Gruppe des BChl besitzt eine zentrale Bedeutung bei der Bindung der Bakteriochlorophylle an die nativen Antennen und RCs. In allen Antennenkomplexen sind entsprechend langwellige Verschiebungen der Raman-Signale, die eine Wasser-stoffbrücken-Bindung der Gruppe an das Protein wiedergeben, zu erkennen [Robert & Lutz 1985]. Diese Bindungen mittels Wasserstoffbrücken sind auch in den Kristall-strukturen [McDermott et al.

1995; Koepke et al. 1996; Mc Luskey et al. 2001] ohne Verzerrung möglich. Deshalb wurde ein besonderes Augenmerk auf die Modifikation des C-3 gelegt.

Im folgenden wird die Rekonstitution mit Fremdpigmenten am Beispiel des [3^1-OH]-BChl ausführlich vorgestellt, da damit ähnlich gute Rekonstitutionsausbeuten wie mit BChl zu erreichen sind [Bandilla et al. 1998]. Ein Vorteil von [3^1-OH]-BChl ist, dass sich sein Absorptionsspektrum sehr stark von dem des BChl unterscheidet (Bild 5-17).

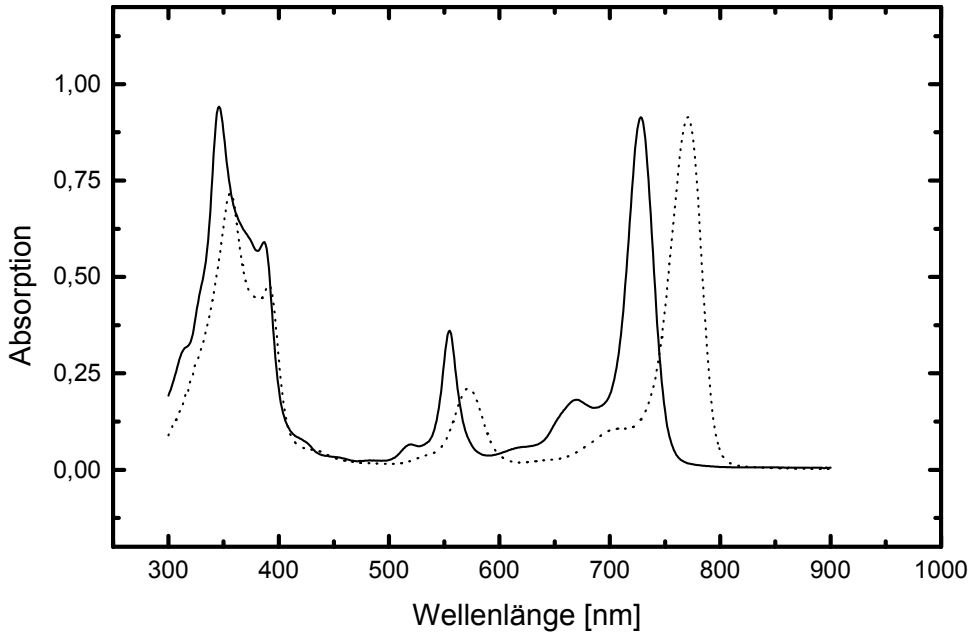


Bild 5-17: Absorptionsspektrum von BChl (· · ·), und von [3^1-OH]-BChl (—) in Ether.

	Wellenlängen [nm]		
	Soret	**Q_x**	**Q_y**
BChl	357	575	772
[3^1-OH]-BChl	346	556	730

Tabelle 5-11: Die Wellenlängen der Absorptionsmaxima von BChl und [3^1-OH]-BChl in Ether

Besonders auffällig sind die Blauverschiebungen der Q_x -Bande von [3^1-OH]-BChl um 19 nm von 575 nm (BChl) auf 556 nm und der Q_y-Bande um 43 nm von 772 nm bei BChl auf 730 nm bei [3^1-OH]-BChl, wodurch ein erfolgreicher Einbau des modifizierten Pigments in die BChl-B800 Bindungstasche von LH2 im Absorptions-spektrum deutlich zu sehen sein sollte.

Folgende Absorptionsspektren und dazugehörigen Maxima wurden nach der Rekonstitution der BChl-B800-Bindungsstelle des LH2-Komplexes aus *Rb. sphaeroides* mit BChl oder [3^1-OH]-BChl gefunden (Bild 5-18 und Tabelle 5-12):

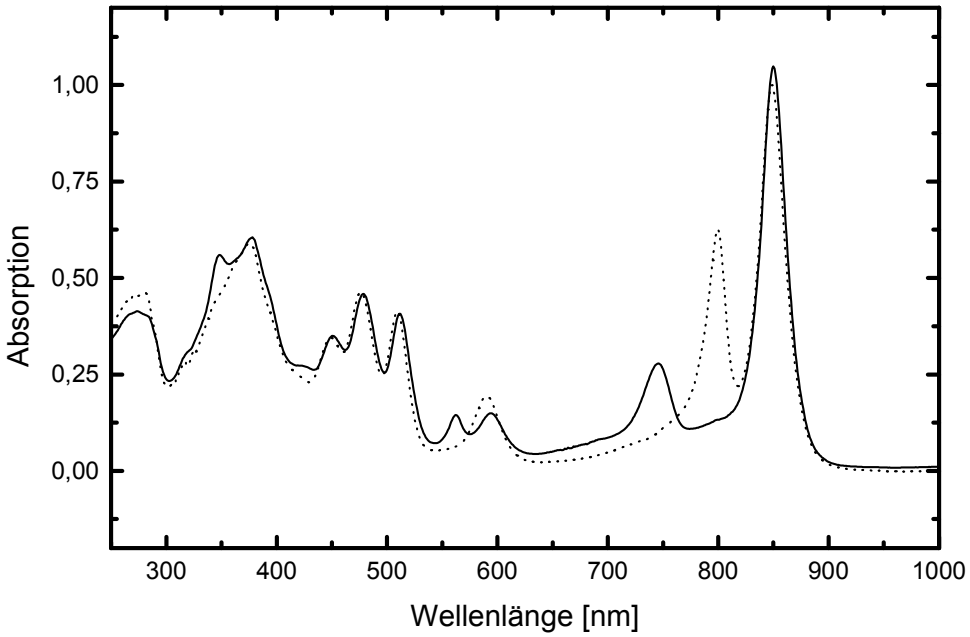


Bild 5-18: Absorptionsspektrum des mit BChl (• • •) und des mit [3^1-OH]-BChl (—) rekonstituierten B800-B850-Komplexes aus *Rb. sphaeroides*. Der mit [3^1-OH]-BChl rekonstituierte Komplex wurde auf die Carotinoide des mit BChl rekonstituierten Komplexes normiert.

	Wellenlängen [nm]				
	Soret	**Carotinoide**	**Q_x**	**Q_y (B800)**	**Q_y (B850)**
$LH2_{BChl}$	375	450/478/511	589	798	848
$LH2_{[3^1\text{-OH}]\text{-BChl}}$	347/375	450/478/512	561/589	746	849

Tabelle 5-12: Die Wellenlängen der Absorptionsmaxima (in nm) des mit BChl bzw. mit [3^1-OH]-BChl rekonstituierten LH2-Komplexes aus *Rb. sphaeroides*.

Das Spektrum des mit [3^1-OH]-BChl rekonstituierten Komplexes wurde auf die Carotinoide des mit BChl rekonstituierten Komplexes normiert, da sich, wie in Kapitel 5.2 gezeigt, lediglich die Lage, aber nicht die Intensität der Banden der Carotinoide während der Rekonstitutionsprozedur verändert.

Die typischen spektralen Blau- (im Bereich der Carotinoide) bzw. Rotverschiebungen der Q_x und Q_y-Banden der BChl-B850, die durch die Entfernung des BChl-B800 aus der Bindungstasche hervorgerufen wurden, sind durch die Besetzung mit dem modifizierten Pigment vollständig reversibel. Damit ist die erste Bedingung für eine erfolgreiche Rekonstitution, die für die jeweils rekonstituierte Antennenform typischen Verschiebungen der Carotinoid-Banden und der Q_x- und Q_y-Banden des BChls, erfüllt.

Die zweite Bedingung, die durch Bindung an das Protein verursachte Rotverschiebung (EIRS) der Absorptionsbanden des extern zugeführten modifizierten Pigments, lässt sich ebenfalls mit Hilfe des Absorptionsspektrums klären: Es finden sich in allen Bereichen der BChl-Übergänge (Soret, Q_x und Q_y) neue Banden. Diese sind gegenüber dem gebundenen BChl deutlich ins Blaue, aber verglichen mit denen des freien [3^1-OH]-BChl ins Rote verschoben. Der EIRS liegt bei 1 nm in der Soret-Bande, bei 5 nm in der Q_x und bei 16 nm in der Q_y-Bande und fällt damit deutlich kleiner aus als der bei der Rekonstitution mit BChl detektierte (Soret = 18 nm, Q_x = 14 nm und Q_y-Bande = 26 nm).

Vergleicht man die Höhe dieser neu entstandenen Q_y-Bande mit dem des nativen B800-850-Komplexes und geht man von einem relativen Extinktionskoeffizienten des [3^1-OH]-BChl von 65 % bezüglich BChl aus [Struck 1991], findet man eine geschätzte durchschnittliche Besetzung der B800-Bindungstaschen mit [3^1-OH]-BChl von etwa 90 %.

Bild 5-19 und Tabelle 5-13 zeigen die CD-Spektren und Bandenlage der mit BChl bzw. [3^1-OH]-BChl rekonstituierten LH2-Komplexe aus *Rb. sphaeroides.*

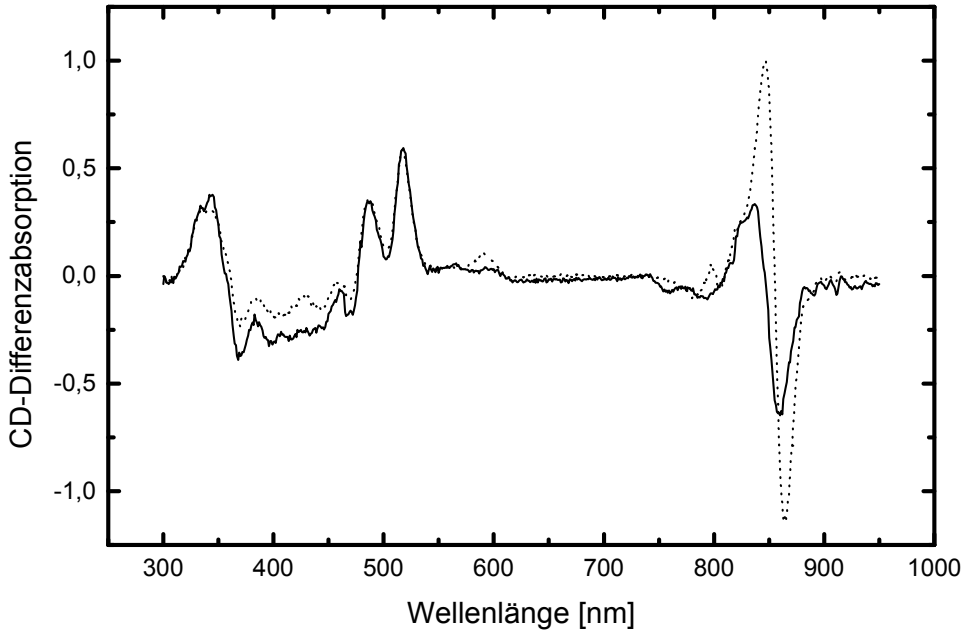


Bild 5-19: CD-Spektren des mit BChl (· · ·) und des mit [3^1-OH]-BChl (—) rekonstituierten B800-B850-Komplexes aus *Rb. sphaeroides*. Das Spektrum des mit [3^1-OH]-BChl rekonstituierten Komplexes wurde auf die Carotinoide des mit BChl rekonstituierten Komplexes normiert.

	Wellenlängen [nm]				
	Soret	**Carotinoide**	**Q_x**	**Q_y(B800)**	**Q_y (B850)**
$LH2_{BChl}$	342(+)/370(-) 385(+)/404(-)	429(+)/459(+)/471(-) 488(+)/519(+)	592(+)	783(-)/807(-)	847(+)/856(0) 866(-)
$LH2_{[3^1\text{-OH}]\text{-BChl}}$	342(+)/370(-) 385(+)/404(-)	429(+)/459(+)/472(-) 489(+)/519(+)	567(+) 594(+)	761(-)/796(-)	839(+)/846(0) 862(-)

Tabelle 5-13: Die Wellenlängen der CD-Maxima und Minima des mit BChl bzw. mit [3^1-OH]-BChl rekonstituierten LH2-Komplexes aus *Rb. sphaeroides.* (+): CD-Maxima, (-) Minima, (0): Schnittpunkt mit der Nulllinie

Der Vergleich der CD-Spektren des mit BChl bzw. [3^1-OH]-BChl rekonstituierten Komplexes zeigt, dass auch hier die durch die Extraktion des BChl-B800 verursachten Bandenverschiebungen im Bereich der Carotinoide und der Q_x- und Q_y-Banden des BChl-B850 durch die Rekonstitution wieder rückgängig gemacht wurden. Desweiteren sind neue Banden in den Bereichen der Q_x- (Maximum bei 567 nm) und Q_y-Übergänge (Maximum 761 nm) zu sehen. Bemerkenswert ist die Blauverschiebung im Q_y-Bereich des BChl-850 im Maximum um 8 nm von 847 nm auf 839 nm und im Minimum um 4 nm von 866 nm auf 862 nm. Die Intensität der Bande ist auf $^1/_3$ der Intensität der Bande des nativen Komplexes gesunken. Die schwache, sigmoidale Doppelbande, die ein Merkmal der nativen Antennenform darstellt, ist wieder vorhanden, nur dass diese erwartungsgemäß gegenüber dem mit BChl rekonstituierten Komplex von 783 nm (positive Bande) und 807 nm (negative Bande) nach 761 nm (positive Bande) und 796 nm (negative Bande) blau verschoben ist. Auch dies deutet auf einen funktionellen Einbau des [3^1-OH]-BChl in die B800-Bindungstasche hin.

Bild 5-20 zeigt das Fluoreszenz-Anregungs- und Emissionsspektrum des mit BChl bzw. [3^1-OH]-BChl rekonstituierten Antennenkomplexes aus *Rb. sphaeroides*.

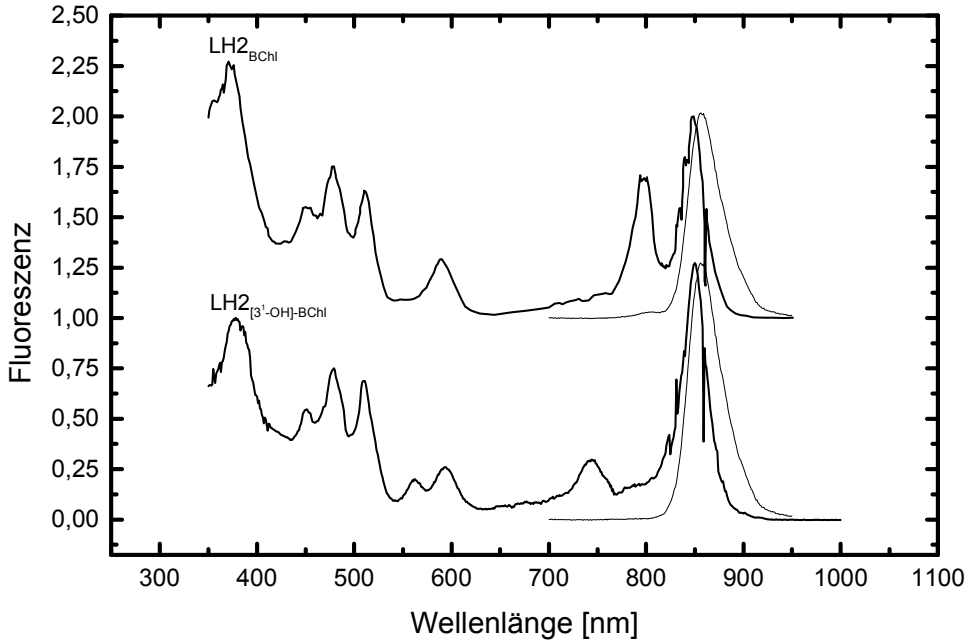


Bild 5-20: Fluoreszenz-Anregungs- und Emissionsspektren des mit BChl (dicke Linien: Anregung bei 858 nm; dünne Linie: Emission bei 785 nm und mit [3^1-OH]-BChl (dicke Linie: Anregung bei 858 nm; dünne Linie: Emission bei 730 nm a rekonstituierten B800-B850-Komplexes aus *Rb. sphaeroides*. Der mit [3^1-OH]-BChl a rekonstituierte Komplex wurde auf die Carotinoide des mit BChl rekonstituierten Komplexes normiert.

Das Fluoreszenz-Anregungsspektrum des mit [3^1-OH]-BChl rekonstituierten Antennenkomplexes gibt alle Banden des Absorptionsspektrums wieder (Bild 5-20 unten). Auch nach selektiver Anregung in der blauen Flanke der Q_y-Bande des [3^1-OH]-BChl ist keine Fluoreszenz des freien Pigments feststellbar (nicht gezeigt). Die in den Absorptionsspektren erkennbaren Banden des [3^1-OH]-BChl stammen daher von einem funktionellen, zum Energietransfer auf das BChl-B850 befähigten Pigment. Die Absorptionsspektren vor und nach der Messung der Fluoreszenz sind unverändert. Dies zeigt, dass die Pigmente aufgrund der Bindung und funktionellen Integration in die Antenne vor Oxidation geschützt sind. Die Fluoreszenzbanden der mit [3^1-OH]-BChl rekonstituierten Antenne weisen bezüglich der nativen vergleichbare Intensitäten auf.

In Bild 5-21 und Tabelle 5-14 ist die Pigment-HPLC-Analyse und die dazugehörigen Retentionszeiten und Pigmentverhältnisse der mit BChl bzw. [3^1-OH]-BChl modifizierten Antenne aus *Rb. sphaeroides* zu sehen.

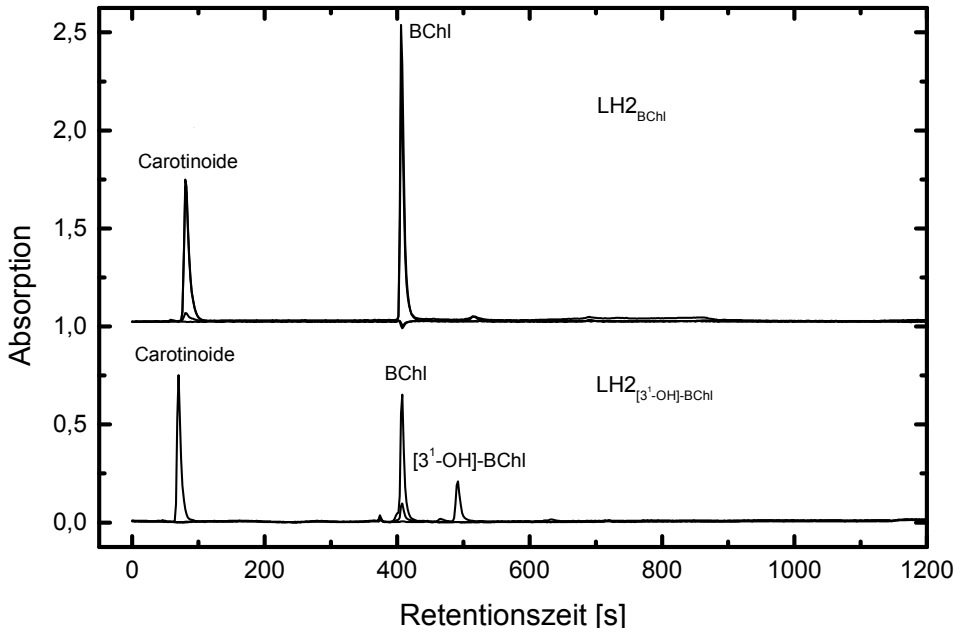


Bild 5-21: HPLC-Analyse des MeOH-Extraktes des mit BChl und mit [3^1-OH]-BChl rekonstituierten B800-B850-Komplexes aus *Rb. sphaeroides*. Genormt wurde auf die Carotinoide. Detektiert wurde bei den Wellenlängen: 520 nm (Spheroidenon); 780 nm (BChl) und 730 nm ([3^1-OH]-BChl)

	Retentionszeit BChl [s]	∫Spheroidenon : ∫BChl : ∫ [3^1-OH]-BChl			
LH2$_{BChl}$	406	1	: 1.43	:	0
LH2$_{[3^1\text{-OH}]\text{-BChl}}$	468	1	: 0.98	:	0.42

Tabelle 5-14: Retentionszeiten in Sekunden der isolierten Pigmente des nativen und des mit [3^1-OH]-BChl rekonstituierten Komplexes und das Verhältnis des Integrals über Spheroidenon zu dem Integral über BChl und dem Integral aus [3^1-OH]-BChl. Das [3^1-OH]-BChl wurde mit Hilfe des relativen Extinktionskoeffizienten des Q_y-Übergangs von 0.65 [Struck 1991] ins Verhältnis zu BChl gesetzt.

Der Anteil des [3^1-OH]-BChl beträgt 30 % des Gesamt-Bakteriochlorophylls, wenn man von einem relativen Extinktionskoeffizienten des [3^1-OH]-BChl von 0.65 bezüglich BChl ausgeht [Struck 1991] und von der mit BChl rekonstituierten Antenne ausgeht. Demzufolge liegt die Eintauschrate auch bei dieser Analyse bei über 90 %. Es sind hier also ähnlich gute Eintauschraten zu beobachten wie mit BChl.

5.4.4 Rekonstitution mit anderen modifizierten Pigmenten

Die Rekonstitution des peripheren Lichtsammlerkomplex aus *Rb.* sphaeroides mit anderen modifizierten Pigmenten erfolgt im wesentlichen nach der gleichen Methode wie die Rekonstitution mit [3^1-OH]-BChl. Die Ergebnisse werden in Tabelle 5-15 zusammengefasst und im folgenden näher erläutert:

Pigment	$\varepsilon_{relativ}$ (Toluol)	Rekonstitutionsrate [%]	Absorptionsbanden des modifizierten „BChl“ im B800-850-Komplex [nm]; Soret/Q_x/Q_y	HPLC Retentionszeiten [s]
$BChl_{nativ}$			375/589/798/848	406
p(850)			377/594/-/851	406
$BChl_{rek}$	1.0	91 %	375/590/798/849	406
[3^1-OH]-BChl	0.65	95 %	348,375/562,592/745/850	468
[3-Vinyl]-BChl	0.75	55 %	353,378/568,592/753,850	382
$BChl_{me}$	1.0	-	-	446
$BChl_{gg}$	1.0	89 %	375/590/798/849	480
BChlid	1.0	-	-	-
[13^2-OH]-BChl	1.0	77 %	375/588/800/850	489
pyro-BChl	1.0	70 %	378/591/799/848	414
Zn-BPhe	0.82	69 %	378/590/791/850	462
BPhe	0.63	-	-	-
Chl	0.94	58 %	378,435/595/668/850	362
[3-Acetyl]-Chl	0.82	54 %	378,448/594/692/849	368

Tabelle 5-15: Pigmente, die in die BChl-B800 Bindungstasche ausgetauscht wurden und ihre relativen Extinktionskoeffizienten des Q_y-Übergangs im Verhältnis zu BChl in Lösung, ihre Eintauschrate in die BChl-B800 Bindungstasche, ihre Absorptionsmaxima nach funktionellem Einbau und ihre Retentionszeit im HPLC.

Die Absorptionsspektren von ausgewählten modifizierten Komplexen werden in Bild 5-22 gezeigt.

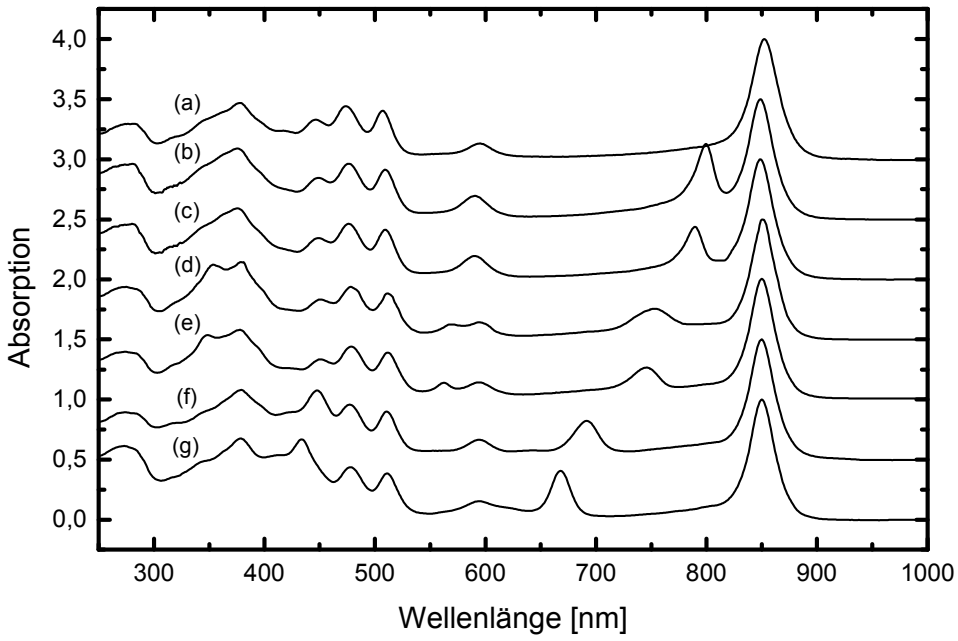


Bild 5-22: Absorptionsspektren peripherer Antennenkomplexe aus *Rb. sphaeroides* nach der Rekonstitution mit unterschiedlich modifizierten Pigmenten. (a): p(850); (b): BChl; (c): Zn-BPhe; (d): Vinyl-BChl; (e): [3^1-OH]-BChl; (f): [3-Acetyl]-Chl; (g): Chl

Modifikation an C-3

Eine weitere Modifikation der 3-Acetyl-Gruppe des BChls ist das [3-Vinyl]-BChl. Das freie [3-Vinyl]-BChl absorbiert in Toluol bei 354, 564 und 748 nm. Nach der erfolg-reichen Rekonstitution von etwa 55 % zeigte die modifizierte Antenne Banden bei 353, 568 und 753 nm (Bild 5-22 d).

Modifikationen an C-17^4

Weitere Rekonstitutionen wurden mit BChl durchgeführt, die eine Modifikation an C-17^4 aufwiesen. Der hydrophobe Phytyl-Rest des BChl spielt eine wichtige Rolle bei der Anordnung und Fixierung der Pigmente im Komplex, wodurch erst die Orientierung der optischen Übergangsdipolmomente zwischen Donor- und Akzeptor-Molekülen gewährleistet werden kann [Freer et al. 1996]. Es ist bei Pigmenten mit Veränderungen am C-17^4 komplizierter, einen erfolgreichen Einbau in die BChl-B800-Bindungstasche festzustellen als

bei Veränderungen am C-3 substituierten Komplex, da diese Modifikationen die gleichen Verschiebungen im Absorptionsspektrum aufweisen wie BChl Deshalb lässt sich dieser Einbau nur mittels HPLC-Pigmentanalyse nachweisen. So ließ sich $BChl_{gg}$ mit einer Rekonstitutionsrate von 89 % genauso gut in die BChl-B800 Bindungstasche einbauen wie das native BChl. Verkürzt man aber den Ester zu einem Methyl-Rest oder verseift ihn zur freien Säure, so konnte kein erfolgreicher Einbau mehr beobachtet werden.

Modifikation an C-13^2

Eine weitere Modifikation des BChl erfolgte am isozyklischen Ring E an Position 13^2. [13^2-OH]-BChl und pyro-BChl zeigen als freie Pigmente nur geringfügige, aber signifikante spektrale Unterschiede zum BChl. So liegt der Q_x-Übergang in Ether beim BChl bei 569 nm und der Q_y-Übergang bei 771 nm, während diese beim [13^2-OH]-BChl bei 577 und 773 nm und beim pyro-BChl bei 573 und 771 nm zu finden sind. Nach einer Rekonstitution sind also nur geringe spektrale Unterschiede zum nativen B800-B850-Komplex zu erwarten. Tatsächlich wurde beim Einbau von [13^2-OH]-BChl in die BChl-B800 Bindungstasche eine Verschiebung der Q_x-Bande um 1 nm von 589 nm der nativen Antenne zu 588 nm im rekonstituierten Komplex beobachtet. Die Bandenlage ist damit analog zum entsprechenden Pigmentaustausch beim RC [Struck 1991]. Die Rekonstitutionsraten sind aber nur durch eine HPLC-Pigmentanalyse zu ermitteln. Dabei wurde eine Eintauschrate von 77 % für [13^2-OH]-BChl und von 70 % für pyro-BChl festgestellt.

Modifikation des Zentralatoms

Eine Rekonstitution durch Substitution des Mg^{2+} in BChl erschien sinnvoll, da durch das Mg^{2+} das Anbinden der Pigmente an die Proteine erfolgt. Der Eintausch sollte mithelfen, die Rolle, die das Zentralatom auf die Integration der Pigmente in den Komplex hat, aufzuklären.

Zunächst wurde versucht, BPhe in den Komplex zu rekonstituieren. Es konnte kein Einbau detektiert werden, was auf die wichtige Funktion des Zentralatoms für die Bindung an das Protein hinweist. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass durch starke Aggregationstendenz des Pigments ein Einbau verhindert wurde.

Der Einbau eines transmetallierten BChl, des Zn-BPhe, war mit einer Besetzung von 69 % möglich. Von Chlorophyll-bindenden Proteinen bzw. Chlorophyll-umsetzenden Enzymen weiß man bereits, dass sie kaum zwischen synthetischen Zn- und natürlichen Mg-Verbindung diskriminieren [Helfrich et al. 1994; 1996]. Nach dem Einbau von Zn-BPhe in die Antenne verschieben sich die Absorptionsmaxima von 558 und 762 nm in Ether deutlich ins Rote nach 590 und 791 nm (Bild 5-22 c).

Rekonstitution mit Chlorinen

Die pflanzlichen Chlorophylle und deren Derivate besitzen ein Tetrapyrrol-Ringsystem (Chlorin), bei dem die Bindung zwischen C7-C8 nicht reduziert ist. Dies hat Auswirkungen auf die Flexibilität des Makrozyklus, die gegenüber dem Bakterio-chlorin-Ringsystem eingeschränkt ist, sowie auf die Raumerfüllung im Bereich des Rings B. Durch die Doppelbindung an Position C7-C8 ist der Ring B in das aromatische Ringsystem mit einbezogen, wodurch sich die spektralen Eigenschaften deutlich ändern.

Das Chl zeigt in Lösung (Ether) gegenüber BChl eine Blauverschiebung der Q_y-Bande in Toluol nach 666 nm und eine Rotverschiebung der Soret-Bande nach 432 nm. Nach der erfolgreichen Rekonstitution in den peripheren Antennenkomplex von *Rb. sphaeroides* befindet sich die Q_y-Bande bei 668 nm und die Soret-Bande bei 435 nm, damit beträgt der EIRS nach dem erfolgreichen Einbau von Chl lediglich 2-3 nm (Bild 5-22 g). Die Eintauschrate betrug 58 %.

Das [3-Acetyl]-Chl ist gegenüber dem BChl nur in Ring B modifiziert. Es absorbiert in Toluol bei 439 nm (Soret) und 687 nm (Q_y). Die Absorptionsbanden nach der Rekonstitution lagen bei 448 nm (Soret) und 692 nm (Q_y), entsprechend einem EIRS in der Soret-Bande von 9 nm und in der Q_y-Bande von 5 nm (Bild 5-22 f). Damit zeigt sich ein deutlich größerer EIRS als bei Chl, was an der Wechselwirkung der Acetylgruppe mit dem Protein liegt. Insgesamt sind bei den Chlorinen allerdings geringere EIRS auszumachen als bei den Bakteriochlorinen, das entspricht den generell geringeren Verschiebungen von Chl in den meisten Chl-Proteinen. Die Eintauschrate betrug 54 %.

Zusammenfassung

Die Selektivität der B800-Bindungstasche wurde mit Pigmenten getestet, welche Modifikationen des Zentralmetalls, des Oxidationsgrads des Makrozyklus, und der Substituenten sämtlicher Ringe beinhalten (Tabelle 5-15). Ähnlich wie bei anderen Bindungstaschen [vgl. Hartwich & Scheer 1995; Davis et al. 1995] gibt es eine Toleranz gegenüber Änderungen im Bereich des Ringes I und des Zentralatoms. In dieser Arbeit gelang es zudem auch, Pigmente mit Modifikationen im Bereich des isozyklischen Ringes in die BChl-B800-Bindungstasche einzubauen, so dass die von Bandilla aufgestellte These, dass es nicht möglich sei, Pigmente mit Modifikationen des isozyklischen Rings in die Antenne einzubauen [Bandilla et al. 1998], widerlegt werden konnte. Bemerkenswert ist die Toleranz der Bindungstasche gegenüber Chlorinen, die bisher lediglich bei der BPhe-Bindungstasche von bakteriellen RC nachgewiesen werden konnte [Struck 1991]. Lediglich Pigmente ohne Zentralatom und solche mit stark verkürzten Resten an Position C-17[4] erlauben keine Rekonstitution.

5.5 Diskussion

Der B800 → B850 Energietransfer im LH2-Komplex aus Purpurbakterien kann dadurch untersucht werden, dass man die Energie-Lücke und damit die spektrale Überlappung zwischen der Q_y-Absorptionsbande des BChl-B800 und des BChl-B850 ändert. Dies konnte bisher nur in begrenztem Umfang durch unterschiedliche Methoden wie die gezielte Mutagenese [Fowler et al. 1993 und 1997], Temperatur- [Pullerits et al. 1997] und Druckbehandlung [Wu et al. 1997] durchgeführt werden. Die spektralen Eigen-schaften des LH2 können jetzt alternativ auch durch den Einsatz von Pigment-Austausch-Methoden geändert werden. Bandilla zeigte, dass die BChl-B800 Moleküle selektiv vom LH2-Komplex entfernt und später durch native bzw. verschiedene modifizierte (Bakterio-) Chlorine ersetzt werden können [Bandilla et al. 1998]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf dieser Methode aufbauend ein stark optimiertes System für die peripheren Antennenkomplexe aus *Rb. sphaeroides* entwickelt, das zusätzlich auf die aus den *Rps. acidophila*-Stämmen 10050 und 7750 ausgeweitet werden konnte.

Diese Pigment-Austausch-Prozedur kann man in zwei Hauptschritte einteilen: Zunächst werden die BChl-B800 durch Säurebehandlung in Anwesenheit des Detergens DM aus ihrer Bindungstasche entfernt und der resultierende p(850)- bzw. p(820)-Komplex über DEAE-Zellulose aufgereinigt. Dann werden die modifizierten Pigmente durch pH-Erhöhung in die B800-BChl-Bindungstasche eingebaut. Im Gegensatz zur Methode von Bandilla [Bandilla et al. 1998], der nur Austauschraten von maximal 50 % erzielte, gelangen mit dem in dieser Arbeit entwickelten Verfahren Rekonstitutionsraten mit extern zugeführtem BChl von bis zu 90 %. Die beobachtete Steigerung der BChl- Eintauschrate kann hauptsächlich auf den Wechsel des Detergens von Triton-BG 10 auf DM während der Rekonstitution zurückgeführt werden. Mit den Detergentien DM und β-OG waren signifikant höhere Besetzungsraten der B800-Bindungsstelle als mit allen anderen getesteten Detergentien möglich. DM und β-OG zählen zu den glykosidischen Detergentien, welche besonders gut zur Stabilisierung von peripheren Antennen-systemen geeignet erscheinen. Aufgrund der großen glykosidischen Reste lagern sich die Detergens-Moleküle vermutlich nur peripher an den Pigment-Protein-Komplex an. Aber auch beim Gebrauch dieser Detergentien ist eine 100 %-ige Rekonstitution aller BChl-B800-Bindungsstellen nicht möglich. Dies kann zwei Gründe haben: Zum einen könnten die Bedingungen für die Rekonstitution noch nicht vollständig optimiert sein, zum anderen könnte eine Beschädigung eines Teils der BChl-B800-Bindungsstellen während der BChl-Extraktion die nachfolgende Rekonstitution dieser Stellen verhindern.

Obwohl die BChl-B800-Bindungsstellen an der Peripherie des LH2 lokalisiert sind, ist es möglich, dass die Extraktion und die nachfolgende Rekonstitution von BChl-Molekülen in die BChl-B800-Bindungstaschen die gesamte Struktur des LH2-Komplexes beeinflusst, da die

BChl-B800 nah genug an den Carotinoiden wie auch an den BChl-B850 lokalisiert sind, um Interaktionen möglich zu machen [Freer et al. 1996]. Diese zentral im LH2-Komplex gelegenen BChl-B850- und Carotinoid-Moleküle sind gut geeignet, die Unversehrtheit der Gesamtstruktur zu zeigen [McDermott et al. 1995; Koepke et al. 1996; Prince et al. 1997]. Dies geschieht am einfachsten durch CD-Spektroskopie. Sie zeigte, dass die Konformationen und die Pigment-Pigment-Wechselwirkungen der BChl-B850 und der Carotinoid-Moleküle im nativen und im BChl-rekonstituierten Komplex sehr ähnlich sind. Dies legt nahe, dass das Pigment-Austausch-Protokoll die Struktur des LH2-Komplexes nicht beeinflusst. Die CD-Spektroskopie kann darüber hinaus auch dazu verwendet werden, die Bindung der BChl-B800-Moleküle im rekonstituierten Komplex zu überprüfen. Das negative CD-Signal, das dem Q_y-Übergang des BChl-B800 (Bereich zwischen 760 – 810 nm) zugeordnet wird, fehlt bei dem p(850)-Komplex, ist aber im rekonstituierten wieder hergestellt. Bei dem BChl-rekonstituierten LH2-Komplex aus *Rb. sphaeroides* konnte sogar das sigmoidale konservative Signal wieder beobachtet werden. Dieses Signal ist auch nach der Rekonstitution mit [3^1-OH]-BChl vorhanden. Es reagiert sehr sensibel auf Veränderungen im Verhältnis von BChl-B850 und BChl-B800 und konnte bei Eintauschraten von 50 % noch nicht beobachtet werden [Bandilla et al. 1998]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die BChl-B800 untereinander koppeln. Diese Wechselwirkung wäre bei geringen Austauschraten und statistischem Einbau sehr gering. Auch die Veränderungen im Soret-, Q_x-, und Carotinoid-Bereich, die im p(850)-Komplex beobachtet worden sind, sind im mit BChl rekonstituierten Komplex wieder rückgängig gemacht worden sind (vgl. Kapitel 5.2 und 5.3.2). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Orientierung und relative Lage der BChl-B800 Moleküle zueinander im rekonstituierten Komplex vergleichbar mit denen im nativen LH2 ist.

Über BChl-Protein-Wechselwirkungen lassen sich mit Hilfe von Resonanz-Raman-Messungen weitere Aussagen treffen. Diese Untersuchungen wurden für rekonstituierte LH2-Komplexe aus *Rps. acidophila* 10050 durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Acetyl-Gruppe des BChl-B800 im rekonstituierten Komplex ebenso durch Wasserstoffbrücken gebunden ist, wie es auch im nativen Komplex der Fall ist [Gall et al. 1999]. Diese Ergebnisse zeigen, dass die rekonstituierten Pigmente korrekt in die BChl-B800-Bindungstasche gebunden sind.

Durch Fluoreszenzmessungen kann gezeigt werden, dass das BChl-B800 im rekonstituierten Komplex einen genauso effizienten Energietransfer B800 → B850 zeigt, wie es in der nativen Antenne der Fall ist. Diese Messungen geben aber keine genaue Bestimmung der Zeitkonstante des B800 → B850 Energietransfers wieder, man kann lediglich sagen, dass der Energietransfer wesentlich schneller als die Fluoreszenz- Lebensdauer der Donor-Pigmente ist. Um zu bestimmen, ob die Zeitkonstanten für den B800 → B850 Energietransfer im nativen und im mit BChl rekonstituierten Komplex vergleichbar sind, müssten Kinetik-Messungen durchgeführt werden. Diese erfolgten nach Abschluss dieser Arbeiten durch

Herek [Herek et al. 2000] an Komplexen, die nach der von mir entwickelten Methode mit mehreren, stufenweise kürzerwellig absorbierenden Pigmenten rekonstituiert wurden. Auch diese Daten belegten eine funktionell kompetente Rekonstitution mit BChl und modifizierten Pigmenten. Sie zeigen darüber hinaus eine stetige Abnahme der Transferkinetik mit einer Blau-verschiebung der Pigmente, wie sie für einen Transfer nach dem Förster-Mechanismus erwartet werden.

Das hier vorgestellte Rekonstitutionsprozedere ermöglicht den Einbau zahlreicher modifizierter (Bakterio-)Chlorine in die B800-Bindungstasche der LH2-Komplexe verschiedener Purpurbakterien. Die Rekonstitutionsexperimente zeigen, dass mit den modifizierten Pigmenten, die in Tabelle 5-15 aufgelistet sind, die B800-Bindungstasche Selektionskriterien folgt, die in einigen Bereichen ähnlich wie bei den BChl- Bindungstaschen des B870 in LH1 [Davis et al. 1996] und den B800 der bakteriellen RCs [Hartwich & Scheer 1995] aus *Rb. sphaeroides* sind, in anderen Bereichen aber deutlich davon abweichen. Diese Kriterien werden im folgenden zusammengefasst:

Eine große Toleranz wurde gegenüber Veränderungen an Position C-3 festgestellt. Sie ist vergleichbar mit der Bindungstasche des BChl-B800 im RC aus *Rb. sphaeroides*, während diese Veränderungen nur in einem Untertyp des LH1 [Davis et al. 1996] toleriert werden.

Modifikationen an Position $C17^4$ gelangen nur, wenn die Seitenkette noch eine ausreichende Länge aufwies. Bei einem Methylester oder der freien Säure war kein Einbau mehr zu beobachten. Allerdings wurden hier keine Alkohole mit mittlerer Kettenlänge untersucht. Im RC ist auch der Methylester eintauschbar [Struck 1991].

Im Gegensatz zu Bandilla [Bandilla et al. 1998], der noch eine Diskriminierung der B800-Bindungstasche bezüglich Veränderungen an Ring V postulierte, konnte ein erfolgreicher Einbau sowohl von pyro-BChl als auch von 13^2-OH-BChl nachgewiesen werden. Damit gehorcht sie in diesem Bereich zwar den Gesetzmäßigkeiten von LH1 aus *Rb. sphaeroides* [Davis et al. 1996], in bakterielle RCs ist jedoch nur der Einbau von 13^2-OH-BChl möglich, während pyro-BChl nicht einbaubar ist [Hartwich & Scheer 1995].

Das zentrale Mg des BChls kann im LH2-Komplex durch Zn ersetzt werden, während das metallfreie BPhe nicht eingebaut wird. Die Diskriminierung zwischen BChl und BPhe scheint eine generelle Eigenschaft aller BChl-Bindungsstellen zu sein, da sie auch für die B800-Bindungsstelle des bakteriellen RC [Hartwich & Scheer 1995] und die des BChl-B875 des LH1 [Davis et al. 1996] aus *Rb. sphaeroides* gilt.

Unterschiede zum bakteriellen RC und LH1 aus *Rb. sphaeroides* ergeben sich aber aus der Toleranz der BChl-B800-Bindungstasche des LH2 gegenüber Chlorinen. So wird sowohl Chl als auch [Acetyl]-Chl von der LH2 B800-Bindungstasche akzeptiert. Dieses Verhalten wurde

in keiner anderen BChl-Bindungstasche gefunden, es ist aber erwähnenswert, dass BPhe-Bindungsstellen im RC auch Phe tolerieren [Meyer & Scheer 1995].

Eine lang diskutierte Frage in der Spektroskopie von (Bakterio-)Chlorophyll-Proteinen ist der Ursprung des EIRS (environment-induced red shift), der für BChl sehr stark zwischen den unterschiedlichen Pigment-Bindungsstellen differiert. Pigment-Pigment- Wechselwirkungen genauso wie Wechselwirkungen zwischen den benachbarten Aminosäuren mittels H-Brücken-Bindungen wurden dabei als wichtige Mechanismen erkannt [Hunter 1995; Gall et al. 1997; Sturgis et al. 1995; Fowler et al. 1992 und 1994]. Zusätzliche Effekte wie z.B. Aufhebung der Planarität des Makrozyklus wurden bei BChl bisher nur wenig untersucht [Gudowska-Nowak et al. 1990; Hartwich & Scheer 1995; Senge 1992], sind aber, wie wir aus hochaufgelösten Röntgenstrukturen wissen, stets vorhanden [Freer et al. 1996; Koepke et al. 1996; Ermler et al. 1994; Deisenhofer & Michl 1993; Tronrud & Matthews 1993; Allen et al. 1987; Chang et al. 1991]. Der Einbau von modifizierten Pigmenten in die monomere B800-Bindungsstelle von bakteriellen RCs [Hartwich & Scheer 1995] und LH2 ist ein Weg, komplementär zu dem der gezielten Mutagenese [Hunter 1995; Gall et al. 1997], zur Quantifizierung der unterschiedlichen Beiträge. Alle verfügbaren Resultate, die auch die Ergebnisse dieser Arbeit beinhalten, zeigen, dass das BChl-B800 keine starke Wechselwirkung mit dem BChl-B850 hat, was auch durch Absorptions- und CD-Spektroskopie belegt werden konnte.

Die unterschiedlichen EIRS in Chl und BChl könnte zum einen die unterschiedlichen Flexibilitäten des Dihydro- (Chlorin) bzw. Tetrahydroporphyrins (Bakteriochlorin)-Systems reflektieren, das aus der unterschiedlichen Aufhebung der Planarität resultiert. Keines der BChl-Moleküle in den strukturell charakterisierten Bindungsstellen ist planar [Freer et al 1996; Koepke et al. 1996; Ermler et al. 1994; Deisenhofer & Michl 1993; Tronrud & Matthews 1993; Allen et al. 1987; Chang et al. 1991]. In den Porphyrinen [Senge 1992; Jentzen et al. 1995] und im BChl c und e, die ja auch Chlorine sind, resultierten diese Abweichungen von der Planarität in teilweise beträchtlichen Rotverschiebungen der Q_y-Bande. Es ist auch experimentell bestätigt, dass Chlorine, die sterisch durch andere C-20-Substituenten gehindert sind, wie BChl d, im Vergleich zu den unsubstituierten deutliche Rotverschiebungen zeigen [Scheer et al. 1986]. Zum anderen könnte der unterschiedliche EIRS in der Anwesenheit und Drehung der Acetyl-Gruppe begründet liegen [Mc Luskey et al. 2001; Gudowska-Nowak et al. 1990].

6 SELEKTIVE REDUKTION VON BCHL-B800 DES LH2 MIT NATRIUMBORHYDRID

6.1 Einführung

Ein alternativer Ansatz, die Pigmentzusammensetzung eines Antennenkomplexes zu verändern, stellt die chemische Modifikation von Kofaktoren im intakten Komplex dar. Eine der bekanntesten Methoden hierfür ist die Reduktion mit Natriumborhydrid. Bei dieser Methode werden Pigmente unabhängig von der verwendeten Antennenart reduziert [Chadwick et al. 1987; Goodwin & Jackson 1993; Shkuropatov et al. 1997]. Dieser Ansatz wurde gewählt, um die beschriebenen Einschränkungen der Austausch-methode, wie die unvollständige Rekonstitution oder eine Beschränkung auf bestimmte Spezies, zu umgehen. Allerdings ist diese Methode auch nur beschränkt anzuwenden, da, ähnlich wie bei der gezielten Mutagenese [Hunter 1995], nur vergleichsweise wenige Modifikationen zugänglich sind, die auch einen funktionellen assemblierten Proteinkomplex ergeben.

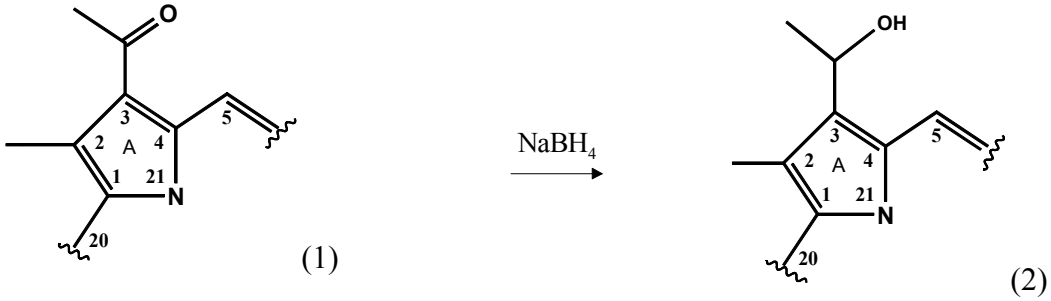
Im Rahmen dieser Arbeit wurden die peripheren Antennen mit $NaBH_4$ reduziert, und die Ergebnisse mit bereits veröffentlichten Ergebnissen verglichen [Chadwick et al. 1987; Goodwin & Jackson 1993]. In diesen Veröffentlichungen wurde LH2 aus *Rps. acidophila* 7750 bzw. *Rb. capsulatus* selektiv mit $NaBH_4$ reduziert, was zu einer Verminderung der Absorption bei 800 nm führte.

Auch der D1-D2-Cytochrom b_{559}-Komplex des Photosystems II konnte erfolgreich durch Zugabe von $NaBH_4$ modifiziert werden [Shkuropatov et al. 1997]. Laut Shkuropatov fand dadurch eine Reduktion eines Pheophytins am inaktiven Ast statt. Er konnte eine Reduktion der Keto-Gruppe an Position C-13^1 beobachten, d.h. die Bildung eines 13^1-deoxo-13^1-hydroxy-Phe.

Allerdings ist $NaBH_4$ ein gefährliches Reagens, da es Proteine hydrolysieren kann, d.h. es kann auch zu unerwünschten Effekten führen. Deshalb erfordert sein Einsatz umfangreiche Kontrollen. Aufgrund spektroskopischer Daten wurde für bakterielle RC von mehreren Arbeitsgruppen eine *in situ* Reaktion des monomeren BChl-B_B am inaktiven Ast durch Zugabe von $NaBH_4$ postuliert [Ditson et al. 1984; Beese et al. 1987; Maroti et al. 1985)]. Die exakte Analyse der modifizierten Komplexe zeigte aber statt der Reduktion des BChl eine Reaktion mit dem Protein [Struck et al. 1991].

6.2 Reaktion von BChl mit $NaBH_4$

In Lösung reduziert $NaBH_4$ selektiv die Acetyl-Gruppe in Position C-3 des BChl zu einer Hydroxyethyl-Gruppe (Bild 6-1).



(1) (2)

Bild 6-1: Reduktion der Acetyl-Gruppe des BChl (1) mittels $NaBH_4$ in Ethanol zur Hydroxyethyl-Gruppe [3^1-OH]-BChl (2)

Diese Reaktion kann absorptionsspektroskopisch verfolgt werden (Bild 6-2 und Tabelle 6-1).

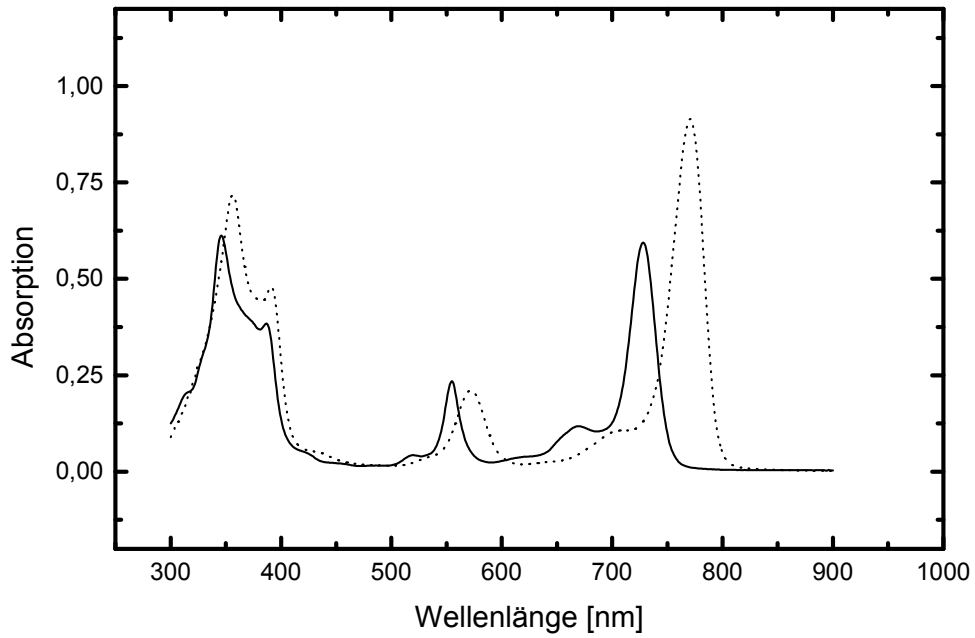


Bild 6-2: Absorptionsspektrum von BChl (• • •) und von [3^1-OH]-BChl (—) in Ether.

	Wellenlängen [nm]		
	Soret	**Q_x**	**Q_y**
BChl	357	575	772
[3^1-OH]-BChl	346	556	730

Tabelle 6-1: Die Wellenlängen der Absorptionsmaxima von BChl und [3^1-OH]-BChl in Ether

Die Q_x-Bande des [3^1-OH]-BChl ist im Vergleich zum BChl um 19 nm von 575 nm auf 556 nm blauverschoben und die Q_y-Bande um 43 nm von 772 auf 730 nm. Das bedeutet für die Umsetzung des LH2-Komplexes mit $NaBH_4$, dass der entstehende Komplex deutlich in der Lage der Banden von dem nativen Komplex verschieden sein sollte. Durch die Rekonstitution mit [3^1-OH]-BChl konnten die spektralen Verschiebungen, des [3^1-OH]-BChl in der BChl-B800-Bindungstasche gezeigt werden (Kapitel 5.4.3). Hier soll die Frage geklärt werden, ob das BChl-B800 selektiv auf die Behandlung mit $NaBH_4$ reagiert. Dann sollte die entstehende Antenne die gleichen spektralen Eigenschaften aufweisen wie der mit [3^1-OH]-BChl rekonstituierte Komplex (Kapitel 5.4.3).

6.3 Selektive Reduktion von BChl-B800 in LH2 aus *Rs. molischianum*

Die Versuche konzentrierten sich zunächst auf den peripheren Antennenkomplex aus *Rs. molischianum*, da er nicht der in Kapitel 5 beschriebenen Rekonstitutionsmethode zugänglich ist.

Chadwick verwendete für seine $NaBH_4$-Versuche mit dem B800-850-Komplex aus *Rps. acidophila* einen 100 mM Tris/HCl Puffersystem, das 0.02 % LDAO enthält, und fügte eine Spatelspitze $NaBH_4$ hinzu [Chadwick et al. 1987]. Diese Versuchsbedingungen wurden zunächst an den LH2-Komplex aus *Rs. molischianum* adaptiert: Bei der Reaktion mit $NaBH_4$ denaturierte die Antenne in dem standardmäßig verwendeten LDAO-haltigen 20 mM Tris-Puffer sehr leicht, da der pH-Wert des Puffers aufgrund des entstehenden Natriumhydroxids stark alkalisch wurde. Diese Erhöhung des pH-Wertes konnte vermieden werden, indem die Pufferkonzentration auf 100 mM Tris gesteigert wurde. Der pH-Wert wurde während der gesamten Reaktionszeit kontrolliert und gegebenenfalls mit 0.02 M HCl nachtitriert.

Die nächste Schwierigkeit bestand darin, den entstehenden Komplex aufzureinigen, da er sich nur schwer an DEAE-Zellulose binden ließ. Ein Wechsel des Säulenmaterials auf Q-Sepharose brachte hier den gewünschten Erfolg einer vollständigen Aufreinigung.

Eine weiteres Problem bestand darin, dass der entstehende B850-Komplex nach der Aufreinigung partiell rekonstituiert war. Dies war aber nicht durch eine Reoxidation des Pigments bedingt, sondern wurde durch einen Sekundäreffekt des LDAO-haltigen Puffersystems verursacht. In diesem Detergens haltigen Puffer wurde partiell BChl-B850 dissoziiert, welches dann teilweise in die B800-Bindungstasche eingebaut wurde [Bandilla et al. 1998]. Durch einen Wechsel des Detergens auf n-Dodecyl-β-maltosid (DM) konnte diese Dissoziation verhindert werden.

Folgende optimale Reaktionsbedingungen wurden für die Antenne aus *Rs. molischianum* gefunden: LH2 wird mit einem 100 mM TD-Puffer pH = 8.0 auf eine Konzentration von 1 cm^{-1} bei λ_{max} verdünnt und portionsweise mit $NaBH_4$ versetzt, bis die Bande bei 800 nm vollständig verschwunden ist. Die Aufreinigung erfolgt, nach einer Dialyse gegen 20 mM TD-Puffer pH = 8.0, säulenchromatographisch über Q-Sepharose.

Die Reaktion des peripheren Lichtsammlerkomplexes mit $NaBH_4$ wurde absorptions-spektroskopisch verfolgt. Bild 6-3 und Tabelle 6-2 zeigen den LH2-Komplex vor und nach der Reaktion, sowie nach der Aufreinigung über Q-Sepharose.

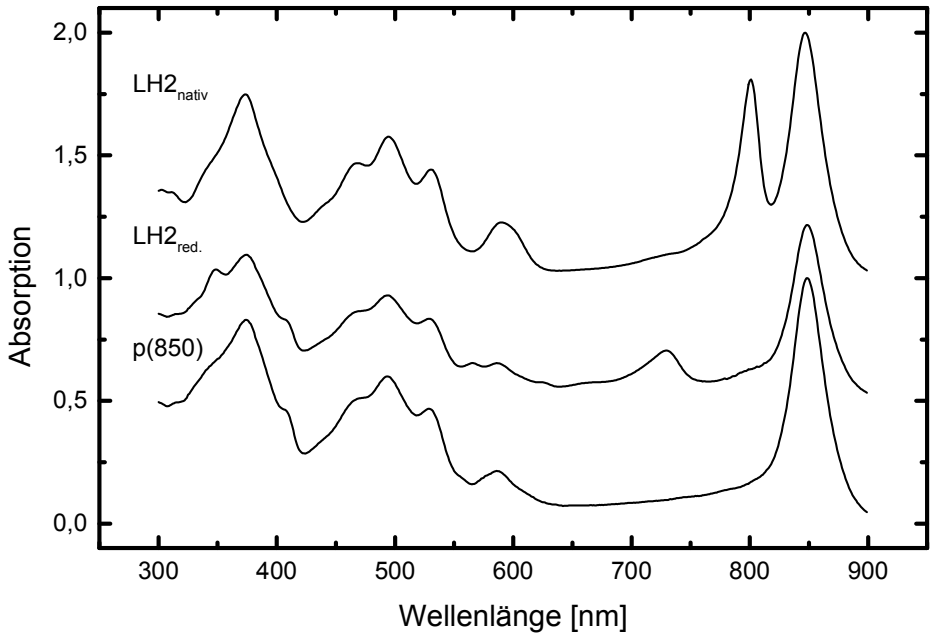


Bild 6-3: Absorptionsspektren des LH2-Komplexes aus *Rs. molischianum* vor ($LH2_{nativ}$), nach der Reaktion mit $NaBH_4$ ($LH2_{red.}$) und nach der Aufreinigung über Q-Sepharose (p(850)).

	Wellenlängen [nm]				
	Soret	**Carotinoide**	**Q_x**	**Q_y(B800)**	**Q_y (B850)**
$LH2_{nativ}$	374	468/495/531	594	801	847
$LH2_{red}$	349/374	470/493/529	565/590	730	850
p(850)	374	470/493/529	590	-	850

Tabelle 6-2: Die Wellenlängen der Absorptionsmaxima des nativen B800-850-Komplexes vor($LH2_{nativ}$) und nach ($LH2_{red.}$) der Reaktion mit $NaBH_4$. p(850) und der über Q-Sepharose aufgereinigte Antennenkomplex aus *Rs. molischianum.*

Generell ist eine Intensitätsabnahme aller Absorptionsbanden von etwa 25 % zu beobachten. Dabei nimmt die Absorption bei 801 nm zugunsten einer neuen Bande bei 730 nm sehr stark ab. Die Position des neu entstandenen Signals entspricht genau der Q_y-Bande des in Lösung befindlichen freien [3^1-OH]-BChl. Zudem entstehen neue Banden im Bereich der Q_x- und Soret-Position, die gegenüber den im Antennenkomplex gebundenen BChl ebenfalls deutlich ins Blaue verschoben sind. So ist eine zusätzliche Q_x-Bande bei 565 nm und eine zusätzliche Soret-Bande bei 349 nm zu erkennen. Die Q_y-Bande des verbleibenden BChl-B850 verschiebt sich um 3 nm von 847 nm auf 850 nm ins Rote, während die Q_x-Bande um 4 nm von 594 nm auf 590 nm ins Blaue verschoben ist. Die Carotinoide sind sowohl rot-, als auch blauverschoben. So bewegt sich die kurzwelligste Carotinoid-Bande um 2 nm von 468 auf 470 nm ins Rote, während sich die beiden langwelligen Banden von 495 auf 493 nm und von 531 auf 529 nm ins Blaue verschieben.

Nach der Aufreinigung über Q-Sepharose sind die Banden bei 730 nm (Q_y), 565 nm (Q_x) und 349 nm (Soret) verschwunden, d.h. das bei der Reaktion mit $NaBH_4$ entstehende 3^1-hydroxylierte Pigment ist dabei vollständig extrahiert worden. Das führt zu einem Komplex, der keine Absorption bei 730 nm mehr aufweist und im folgenden p(850)-Komplex genannt wird. Die spektralen Verschiebungen im Bereich der Carotinoide und der Q_x- und Q_y-Bande bleiben auch nach der Aufreinigung bestehen (Bild 6-3; Tabelle 6-2).

Bild 6-4 und Tabelle 6-3 zeigen die DAD-HPLC-Chromatogramme und die dazu-gehörigen Retentionszeiten des nativen und des mit $NaBH_4$ reduzierten LH2-Komplexes aus *Rs. molischianum*.

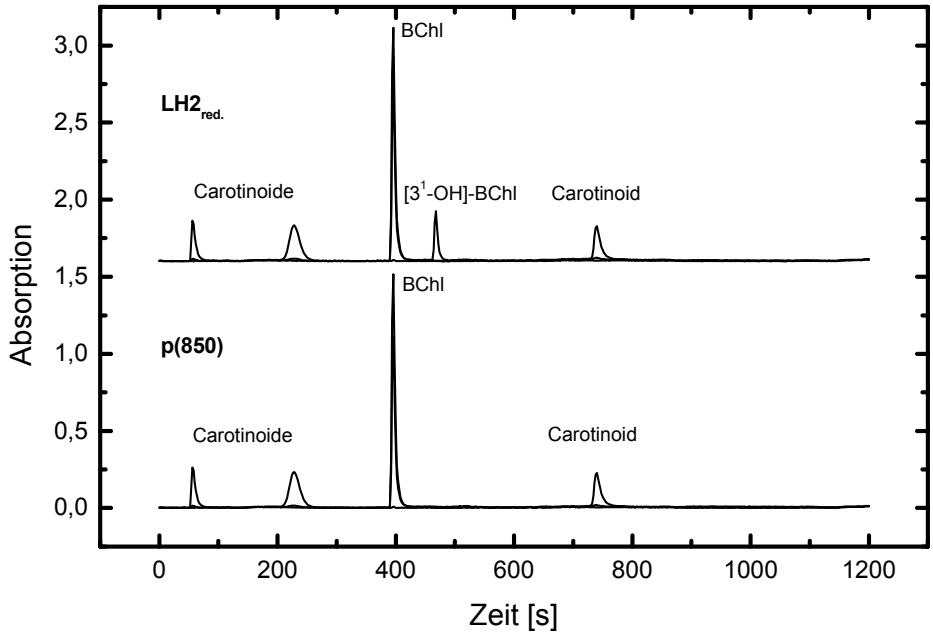


Bild 6-4: HPLC-Chromatogramm des MeOH-Extraktes des LH2-Komplexes nach der Reaktion mit $NaBH_4$ ($LH2_{red.}$) und des aufgereinigten p(850)-Komplexes aus *Rs. molischianum.* Normiert wurde auf die Carotinoid-Bande; detektiert wurde bei den Wellenlängen: 484 nm (Lycopin und Rhodopin), 780 nm (BChl) und 730 nm ([3^1-OH]-BChl).

	Carotinoide [s]	**BChl [s]**	**[3^1-OH]-BChl [s]**
$LH2_{red}$	56 / 226 / 740	400	464
p(850)	60 / 224/ 744	398	-

Tabelle 6-3: Retentionszeiten der Pigmente des LH2-Komplexes nach der Reaktion mit $NaBH_4$ und des aufgereinigten p(850)-Komplexes aus *Rs. molischianum*.

Wird an dem unaufgereinigten Komplex eine DAD-HPLC durchgeführt (Bild 6-4 oben; Tabelle 6-3:), konnte man dieses Pigment aufgrund der Retentionszeit von 464 s und des dazugehörigen Spektrums (nicht gezeigt) eindeutig als [3^1-OH]-BChl identifizieren (Bild 6-4 oben; Tabelle 6-3:). Dabei erhält man ein Verhältnis von BChl : [3^1-OH]-BChl von 2,3 : 1. Nach der Aufreinigung über Q-Sepharose ist das [3^1-OH]-BChl vollständig verschwunden (Bild 6-4 unten; Tabelle 6-3:).

Bild 6-5 und Tabelle 6-4 zeigen das CD-Spektrum sowie die dazugehörigen Extremwerte des nativen und des aufgereinigten p(850)-Komplexes aus *Rs. molischianum*.

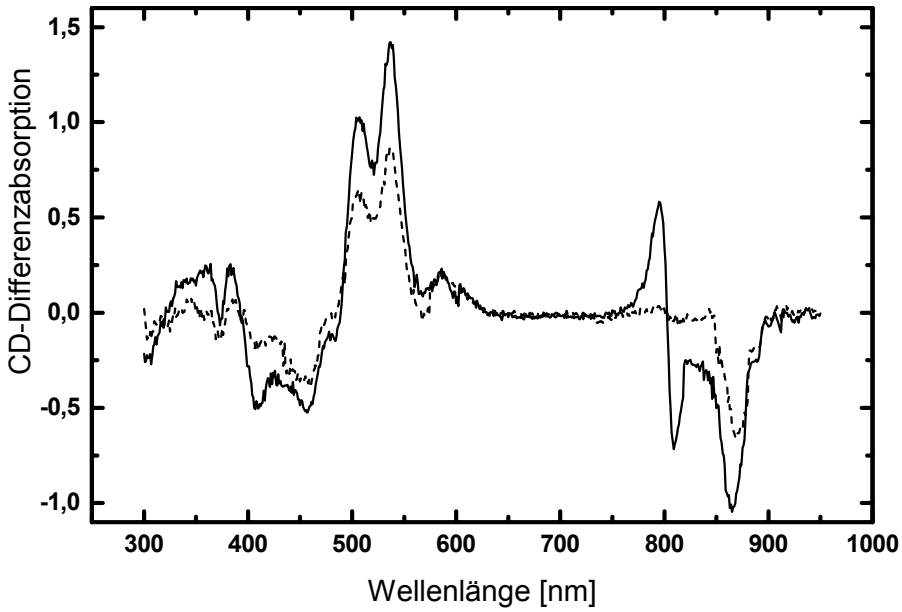


Bild 6-5: CD-Spektren des nativen LH2-Komplexes (· · ·) sowie den aufreinigte p(850)-Komplex (—) aus *Rs. molischianum.*

	Wellenlängen [nm]				
	Soret	**Carotinoide**	**Q_x**	**Q_y(B800)**	**Q_y (B850)**
$LH2_{nativ}$	362(+)/375(-) 384(+)/409(-)	457(-) / 508(+) 538(+)	590(+)	796(+) / 803(0) 810(-)	867(-)
p(850)	362(+)/375(-) 384(+)	461(-) 506(+) 537(+)	588(+)	-	870(-)

Tabelle 6-4: Die Wellenlängen der CD-Maxima und Minima des nativen und des p(850)-Komplexes aus *Rs. molischianum.* (+): CD-Maxima, (-): CD Minima, (0): Schnittpunkt mit der Nulllinie

Die für LH2 aus *Rs. molischianum* typische, intensive sigmoidale Bande im 800 nm-Bereich verschwindet weitgehend, übrig bleibt nur eine sehr schwache S-förmige Bande im Bereich zwischen 790 und 810 nm, die auf Reste des BChl-B800 hindeuten könnten, welche im Absorptionsspektrum in der kurzwelligen Flanke der 850 nm Bande untergehen. Die Q_y-Bande des verbleibenden BChl-B850 verschiebt sich um 3 nm von 867 nm auf 870 nm ins Rote, während die Q_x-Bande um 2 nm von 590 nm auf 588 nm ins Blaue verschoben ist. Die komplexen CD-Banden der Carotinoide zeigen eine Rot-verschiebung der kurzwelligsten Carotinoid-Bande um 4 nm von 457 auf 461 nm und eine Blauverschiebung der beiden

langwelligen Banden von 508 auf 506 nm und von 538 auf 537 nm. Die Bande im Soret-Bereich bei 409 nm ist verschwunden.

Das Fluoreszenz-Anregungsspektrum (Bild 6-6) des aufgereinigten p(850)-Komplexes aus *Rs. molischianum* gleicht in der Lage der Banden dem Absorptionsspektrum (Bild 6-3).

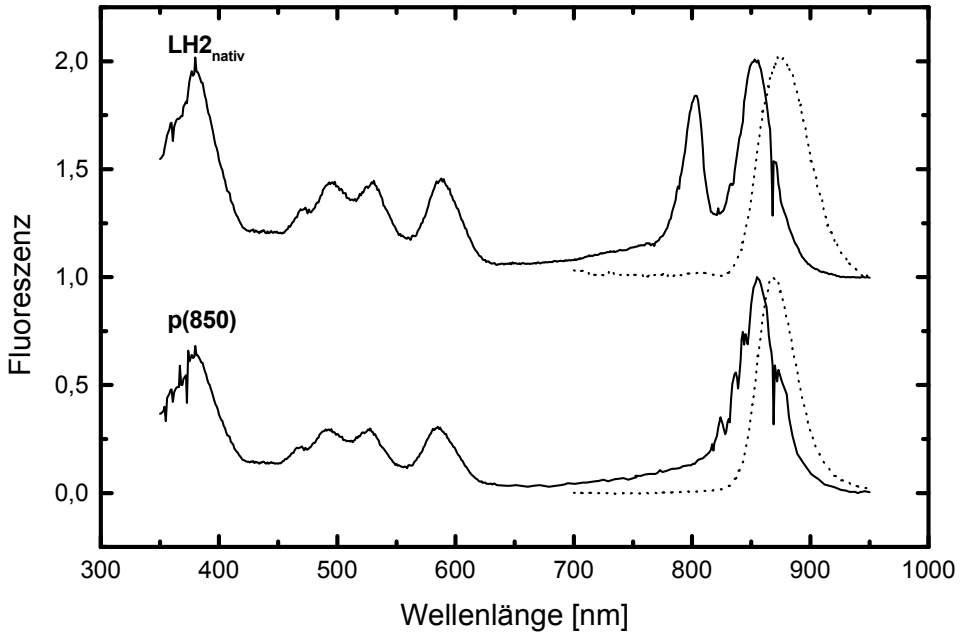


Bild 6-6: Fluoreszenzanregungs- und Emissionsspektren des nativen LH2- (Anregung bei 858 nm; Emission bei 785 nm (• • •)) und des aufgereinigten p(850)-Komplexes (Anregung bei 858 nm (—) Emission bei 730 nm (• • •)) aus *Rs. molischianum.*

Im Anregungsspektrum des p(850)-Komplexes zeigen die Banden der Carotinoide die gleiche Verschiebung wie im Absorptionsspektrum und sind, gemessen an der mittleren Carotinoid-Bande, auf ungefähr 50 % ihres Anfangswertes gesunken. Dies deutet auf eine reduzierte Quantenausbeute ϕ_{EET} des Energietransfers von den Carotinoiden auf die BChl-B850 hin, was für eine Beteiligung des BChl-B800 am Energietransfer spricht.

Das Emissionsspektrum (Bild 6-6), das durch die Anregung in der langwelligsten Carotinoid-Bande bei einer Anregungswellenlänge von 531 nm bei $LH2_{nativ}$ bzw. von 529 nm bei p(850) entstanden ist, ist vergleichbar mit dem des unveränderten Komplexes. Es findet sich lediglich eine Blauverschiebung von 2 nm von 865 nm auf 867 nm.

Die Protein-Zusammensetzung wurde mit Hilfe denaturierender Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE) überprüft. Der native wie auch der p(850)-Komplex aus *Rs. molischianum* zeigen eine unveränderte Proteinzusammensetzung (Bild 6-7) bestehend aus

den zwei Polypeptid-Untereinheiten α und β. Dabei konnte für beide Komplexe ein scheinbares Gewicht von 4.5 kDa für α und 3.5 kDa für β ermittelt werden.

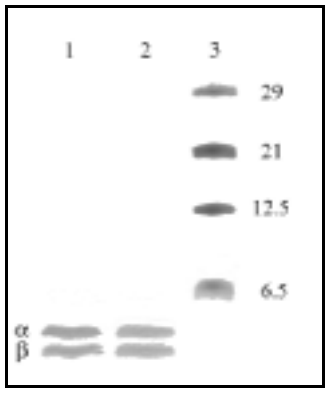


Bild 6-7: SDS-PAGE der α und β–Polypeptide aus dem nativen LH2-Komplex und aus p(850)-Komplex aus *Rs. molischianum*. Reihe 1: $LH2_{nativ}$; Reihe 2: p(850); Reihe 3: Proteinmarker [kDa]

6.4 Selektive Reduktion von BChl-B800 in LH2 aus anderen Bakterien

Die selektive Reduktion des peripheren Antennenkomplexes mit $NaBH_4$ wurde auch bei den LH2-Komplexen aus *Rb. sphaeroides* und den beiden *Rps. acidophila*-Stämmen 10050 und 7750 untersucht. Die Reaktionsbedingungen, die für LH2 aus *Rs. molischianum* ermittelt wurden, konnten ohne Veränderung auf die Antennen aus *Rb. sphaeroides* und die beiden *Rps. acidophila*-Stämme angewendet werden: LH2 wird mit einem 100 mM TD-Puffer pH = 8.0 verdünnt und portionsweise mit $NaBH_4$ versetzt, bis die Bande bei 800 nm vollständig verschwunden ist. Die Aufreinigung erfolgt nach einer Dialyse gegen 20 mM TD-Puffer pH = 8.0 säulenchromatographisch über Q-Sepharose.

Tabelle 6-5 und Tabelle 6-6 gibt eine zusammenfassende Übersicht über die Reduktion des BChl-B800 mit $NaBH_4$ aus den gewählten Stämmen von *Rps. acidophila* 7750 und 10050, *Rs. molischianum* sowie *Rb. sphaeroides* und deren Einfluss auf das Absorptionsverhalten, sowie den Energietransfer von den Carotinoiden bzw. dem [3^1-OH]-BChl auf die BChl-B850. Die Ergebnisse werden im folgenden näher erläutert.

Bakterien	**Reaktion mit $NaBH_4$(Bindungszustand)**
***Rps. acidophila* 7750**	reduziert (gekoppelt)
***Rps. acidophila* 10050**	reduziert (gekoppelt/frei)
Rs. molischianum	reduziert (frei)
Rb. sphaeroides	reduziert (gekoppelt)

Tabelle 6-5: Vergleich der Reaktivitäten von LH2-Komplexen gegenüber $NaBH_4$. reduziert: BChl-B800 wird mit $NaBH_4$ zu [3^1-OH]-BChl reduziert; gekoppelt: [3^1-OH]-BChl ist funktional in dem Antennenkomplex gebunden; frei: [3^1-OH]-BChl kann chromatographisch von der Antenne abgetrennt werden

Bakterien	**Q_y-Absorption**		**CD-Signal**		**Energietransfer**	
	800	850	800	850	"800"	Car
***Rps. acidophila* 7750**	←	↙	←	↙	±	±
***Rps. acidophila* 10050**	←	↙	←	↙	±	±
Rs. molischianum	←	↘	-	↘	-	↓
Rb. sphaeroides	←	↙	←	↙	±	±

Tabelle 6-6: Vergleichende Übersicht über die spektralen Auswirkungen der Behandlung von nativem LH2 verschiedener LH2-Komplexe mit $NaBH_4$ nach deren Aufreinigung. ←: Blauverschiebung; ↙: Abnahme der Absorption und Blauverschiebung; ↘: Abnahme der Absorption und Rotverschiebung; ↓: Energietransfer von den Carotinoiden nimmt ab; -: keine Absorption/kein Energietransfer; ±: keine spektrale Veränderung.

Bild 6-8 und Tabelle 6-7 zeigt die Absorptionsspektren des nativen und des mit $NaBH_4$ reduzierten und anschließend über Q-Sepharose aufgereinigten peripheren Antennenkomplexes aus *Rb. sphaeroides.* Die Komplexe aus den beiden *Rps. acidophila*-Stämmen verhalten sich analog zu dem aus *Rb. sphaeroides* und werden nur bei abweichenden Ergebnissen nochmals explizit erwähnt.

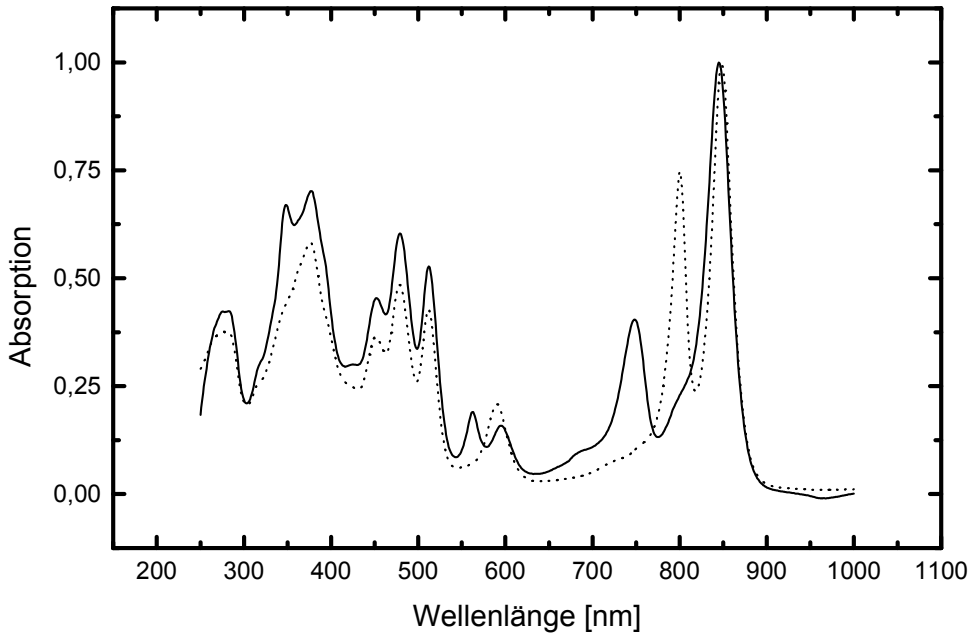


Bild 6-8: Absorptionsspektren des nativen ($LH2_{nativ}$ (• • •)) und des mit $NaBH_4$ reduzierten und aufgereinigten ($LH2_{[3^1\text{-OH]-BChl}}$ (—)) LH2-Komplexes aus *Rb. sphaeroides*.

	Wellenlängen [nm]				
	Soret	**Carotinoide**	**Q_x**	**Q_y (B800)**	**Q_y (B850)**
$LH2_{BChl}$	375	450/478/511	589	798	848
$LH2_{[3^1\text{-OH]-BChl}}$	347/375	450/478/511	561/589	746	846

Tabelle 6-7: Die Wellenlängen der Absorptionsmaxima des nativen ($LH2_{nativ}$) und des mit $NaBH_4$ reduzierten und aufgereinigten ($LH2_{[3^1\text{-OH]-BChl}}$) LH2-Komplexes aus *Rb. sphaeroides*.

Die Antenne aus *Rb. sphaeroides* verhält sich bei der Behandlung mit $NaBH_4$ ähnlich wie die aus *Rs. molischianum*. Die Bande bei etwa 800 nm verschwindet, und es treten neue Banden im Bereich des Soret- (347 nm), des Q_x- (561 nm) und des Q_y-Übergangs (746 nm) auf. Die neu gebildete Bande des Q_y-Übergangs bei 746 nm ist somit gegenüber dem freien Pigment (Q_y-Bande bei 730 nm; Tabelle 6-1) um 16 nm rot-verschoben und liegt damit bei der gleichen Wellenlänge wie bei der Rekonstitution von p(850) mit extern zugeführtem [3^1-OH]-BChl. Die Q_y-Bande des BChl-850 verschiebt sich um 2 nm von 848 nm auf 846 nm ins

Blaue. Im Gegensatz zur Antenne bei *Rs. molischianum* tritt aber keine Verschiebung im Bereich der Carotinoide auf. Das Pigment lässt sich selbst nach mehrmaliger Aufreinigung über Q-Sepharose nicht vom Komplex abtrennen. Dies deutet auf eine unterschiedliche Bindungssituation des neu gebildeten Pigments bei *Rb. sphaeroides* im Vergleich zu *Rs. molischianum* hin, d.h. in der BChl-B800-Bindungstasche von *Rb. sphaeroides* ist das [3^1-OH]-BChl „akzeptiert“, aber nicht in der von *Rs. molischianum*.

Um zu überprüfen, ob es sich auch bei der Antenne aus *Rb. sphaeroides* nach der Reaktion mit $NaBH_4$ bei dem neu gebildetem Pigment um [3^1-OH]-BChl handelt und in welchem Verhältnis es zu den anderen Pigmenten vorhanden ist, wurde eine DAD-HPLC durchgeführt (Bild 6-9 und Tabelle 6-8).

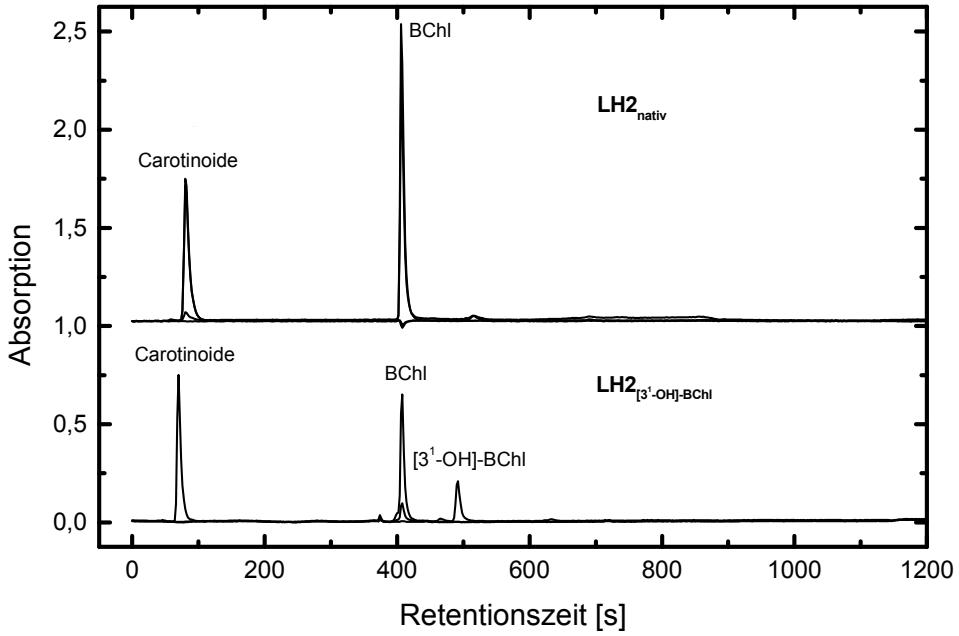


Bild 6-9: HPLC-Chromatogramm des MeOH-Extraktes des nativen ($LH2_{nativ}$) und des mit $NaBH_4$ reduzierten und aufgereinigten ($LH2_{[3^1\text{-OH}]\text{-BChl}}$) LH2-Komplexes aus *Rb. sphaeroides*. Normiert wurde auf die Carotinoide; detektiert wurde bei den Wellenlängen 520 nm (Spheroidenon); 780 nm (BChl) und 730 nm ([3^1-OH]-BChl).

	Retentionszeit BChl [s]	∫BChl : ∫[3^1-OH]-BChl : ∫Carotinoide
LH2$_{nativ}$	406	1.59 : 0 : 1
LH2$_{[3^1\text{-OH]-BChl}}$	468	0.94 : 0.44 : 1

Tabelle 6-8: Retentionszeiten des BChl und des [3^1-OH]-BChl, sowie das Verhältnis des Integrals über Spheroidenon zu dem Integral über BChl und dem Integral aus [3^1-OH]-BChl des nativen und des mit $NaBH_4$ reduzierten und aufgereinigten LH2-Komplexes aus *Rb. sphaeroides*. Das [3^1-OH]-BChl wurde mit Hilfe des relativen Extinktionskoeffizienten des Q_y-Übergangs von 0.65 ins Verhältnis zu BChl gesetzt [Struck 1991].

Nach der Aufreinigung beträgt das Mengenverhältnis von BChl zu 3^1-OH-BChl beim Komplex aus *Rb. sphaeroides* 2.1 : 1, dies ist innerhalb der Fehlergrenze das zu erwartende Verhältnis von 2 : 1, wenn alle B800-Bindungsstellen durch das 3^1-OH-BChl besetzt sind. Beim LH2-Komplex aus *Rps. acidophila* 7750 ist das Verhältnis ähnlich gut bei 2.4 : 1, lediglich die Antenne *Rps. acidophila* 10050 weist ein weit schlechteres Verhältnis von 4.2 : 1 auf, was auf einen teilweisen Verlust des neugebildeten Pigments hindeutet, oder eine unvollständige Reduktion. Da hier die Bande bei 802 nm nicht vollständig entfernt werden konnte, ist erstere Annahme wahrscheinlich.

In Bild 6-10 und Tabelle 6-9 werden die CD-Spektren des nativen mit denen der reduzierten Antenne aus *Rb. sphaeroides* verglichen.

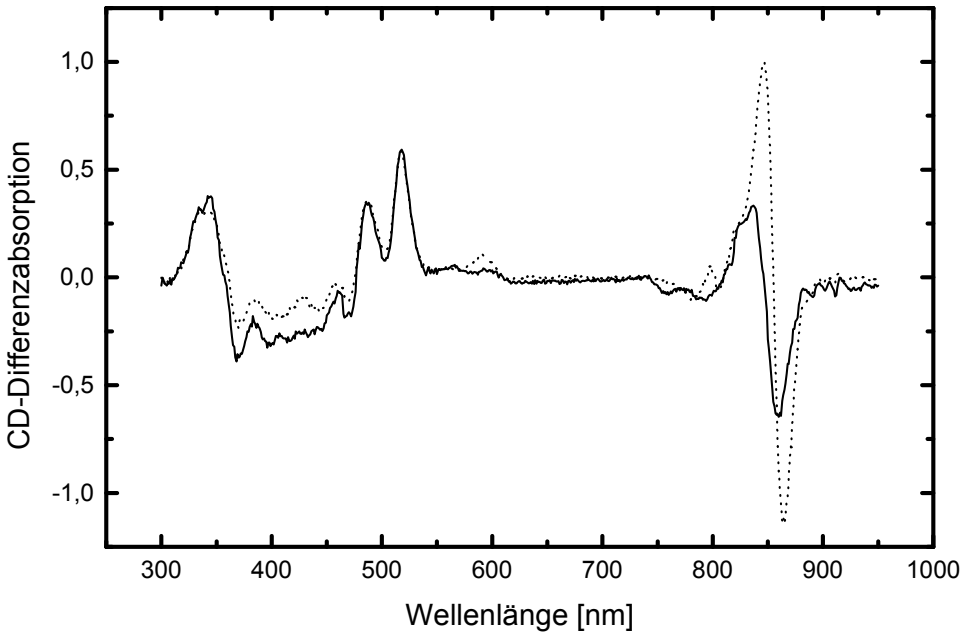


Bild 6-10: CD-Spektrum des nativen ($LH2_{nativ}$ (• • •)) und des mit $NaBH_4$ reduzierten und aufgereinigten ($LH2_{[3^1\text{-OH]-BChl}}$ (—)) LH2-Komplexes aus *Rb. sphaeroides*. $LH2_{[3^1\text{-OH]-BChl}}$ wurde auf die Carotinoide nativen Komplexes genormt.

	Wellenlängen [nm]				
	Soret	**Carotinoide**	**Q_x**	**Q_y(B800)**	**Q_y (B850)**
$LH2_{nativ}$	342(+)/370(-) 385(+)/404(-)	429(+)/459(+)/471(-) 488(+)/519(+)	592(+)	783(-)/807(-)	847(+)/856(0) 866(-)
$LH2_{[3^1\text{-OH]-BChl}}$	342(+)/370(-) 385(+)/404(-)	429(+)/459(+)/471(-) 488(+)/519(+)	567(+) 593(+)	761(-)/796(-)	840(+)/846(0) 863(-)

Tabelle 6-9: Die Wellenlängen-Maxima und Minima des nativen ($LH2_{nativ}$) und des mit $NaBH_4$ reduzierten und aufgereinigten ($LH2_{[3^1\text{-OH]-BChl}}$) LH2-Komplexes aus *Rb. sphaeroides*. (+): CD-Maxima; (-): CD Minima; (0): Schnittpunkt mit der Nulllinie.

Im CD findet man bei dem mit $NaBH_4$ reduzierten Komplex intensive Q_x-Banden mit einem Maximum bei 567 nm und Q_y-Banden mit einem Maximum bei 761 nm. Genau wie bei der Rekonstitution mit extern zugesetztem [3^1-OH]-BChl stellt man hier eine deutliche Blauverschiebung im Q_y-Bereich des BChl-850 im Maximum um 7 nm von 847 nm auf 840 nm und im Minimum um 3 nm von 866 nm auf 863 nm fest. Die Intensität der Bande ist auf

$^1/_3$ der Intensität der Bande des nativen Komplexes gesunken. Die schwache, sigmoidale Doppelbande, die ein konstantes Merkmal der nativen Antennenform darstellt, ist wieder vorhanden, nur dass diese erwartungsgemäß gegenüber dem mit BChl rekonstituierten Komplex von 783 und 807 nm nach 761 und 796 nm blau verschoben ist.

Bild 6-11 zeigt das Fluoreszenzanregungs- und Emissionsspektrum des nativen und des mit $NaBH_4$ reduzierten LH2-Komplexes aus *Rb. sphaeroides*.

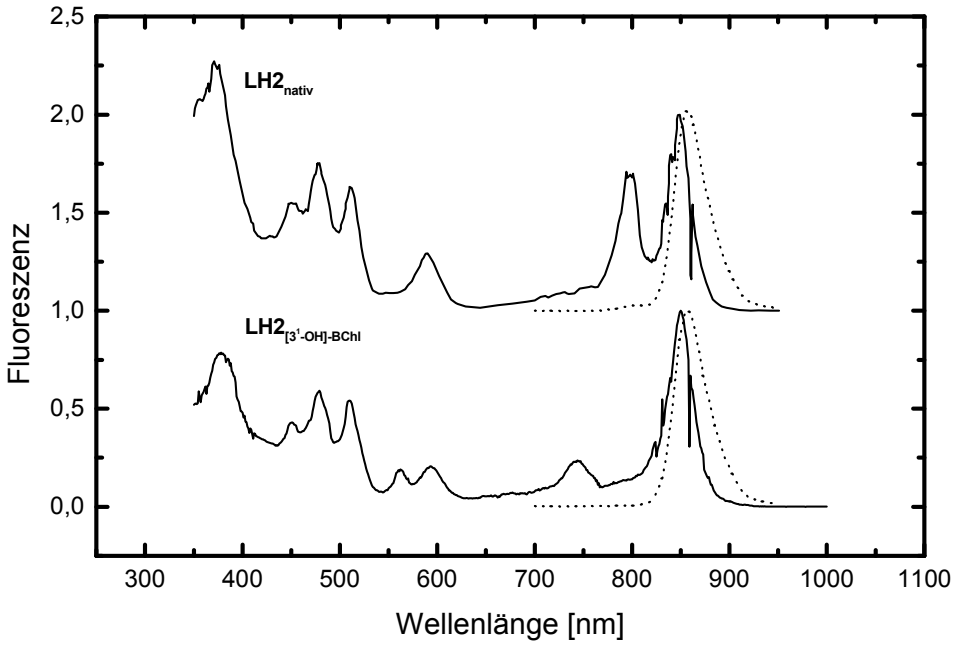


Bild 6-11: Fluoreszenzanregungs- und Emissionsspektrum des nativen ($LH2_{nativ}$ Anregung bei 858 nm (• • •); Emission bei 785 nm (—)) und des mit $NaBH_4$ reduzierten und aufgereinigten ($LH2_{[3^1\text{-OH}]\text{-BChl}}$ Anregung bei 858 nm (• • •); Emission bei 730 nm (—)) LH2-Komplexes aus *Rb. sphaeroides*.

Das Fluoreszenz-Anregungsspektrum des mit $NaBH_4$ reduzierten und anschließend aufgereinigten Antennenkomplexes gibt alle Banden des Absorptionsspektrums wieder (Bild 5-20 unten). Auch nach selektiver Anregung in der blauen Flanke der Q_y-Bande des [3^1-OH]-BChl ist keine eigene Fluoreszenz dieses Pigments feststellbar, d.h. es erzeugt auch eine Emission bei 858 nm, wie es auch bei der nativen Antenne der Fall ist. Die in den Absorptionsspektren erkennbaren Banden des [3^1-OH]-BChl stammen daher von einem funktionalen-, antennengebundenen Pigment. Die Analyse der Absorptions- und

Fluoreszenzdaten belegen, dass das [3^1-OH]-BChl eine in etwa vergleichbar hohe ϕEET wie das ursprüngliche BChl auf die BChl-B850 aufweist.

Die Protein-Zusammensetzung wurde auch hier wieder mit Hilfe denaturierender Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE) überprüft. Die native wie die nach der Reduktion mit $NaBH_4$ erhaltene und aufgereinigte Antenne aus *Rb. sphaeroides* zeigt eine unveränderte Proteinzusammensetzung (Bild 6-12) bestehend aus den zwei Polypeptid-Untereinheiten α und β. Dabei konnte für α ein scheinbares Gewicht von 4.5 kDa und für β von 3.5 kDa ermittelt werden.

Bild 6-12 SDS-PAGE der aus der nativen und der mit $NaBH_4$ reduzierten und aufgereinigten Antenne erhaltenen α und β–Polypeptide aus *Rb. sphaeroides*. Reihe 1: Proteinmarker [kDa]; Reihe 2: $LH2_{nativ}$; Reihe 3: $LH2_{[3^1\text{-OH}]\text{-BChl}}$

6.5 Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass bei Umsetzung von $NaBH_4$ mit LH2-Komplexen aus *Rps. acidophila* 7750 bzw. 10050, *Rs. molischianum* und *Rb. sphaeroides* selektiv das BChl-B800 zu [3^1-OH]-BChl reduziert wird. Dies konnte durch DAD-HPLC (Bild 6-4 und Bild 6-9 sowie Tabelle 6-3 und Tabelle 6-8) verifiziert werden. Nach der Aufreinigung über Q-Sepharose der $NaBH_4$-behandelten Antennen konnten zwei unterschiedliche Typen von Komplexen isoliert werden.

Bei den Lichtsammler-Komplexen aus *Rb. sphaeroides* und *Rps. acidophila* 7750 ist quantitativ das gebildete [3^1-OH]-BChl funktional an die Antenne gebunden und kann auch durch mehrmalige Aufreinigung nicht entfernt werden. Die spektralen Eigenschaften in den Absorption- und CD-Spektren des mit Borhydrid behandelten Komplexes sind analog mit

denen des mit [3^1-OH]-BChl rekonstituierten aus *Rb. sphaeroides* (vgl. Bild 5-18 bzw. Tabelle 5-12 mit Bild 1-6 bzw. Tabelle 6-7 sowie Bild 5-19 bzw. Tabelle 5-13 mit Bild 6-10 bzw. Tabelle 6-9). Der einzige Unterschied ist in der Q_y-Bande des BChl-B850 zu verzeichnen. Während sich bei der Rekonstitution diese Bande um 1 nm von 848 nm im Nativen auf 849 nm bei dem rekonstituierten Komplex ins Rote verschiebt, verschiebt sich diese Bande im mit $NaBH_4$-behandelten Komplex um 2 nm ins Blaue. Dies könnte auf eine veränderte Protein-BChl-B800 Wechselwirkung hindeuten, die Struck auch bei den bakteriellen RCs postuliert [Struck et al. 1991]. Der Energietransfer des neu gebildeten Pigments auf das BChl-B850 ist nahezu unverändert verglichen mit dem des nativen Komplexes (Bild 6-11), ebenso die Größe der Apoproteine α und β (Bild 6-12).

Rps. acidophila 10050 zeigt eine schwächere Bindung des [3^1-OH]-BChl an den Komplex. So lässt sich hier das modifizierte Pigment durch Chromatographie etwa zur Hälfte entfernen, die andere Hälfte ist aber auch hier funktional gebunden.

Bei *Rs. molischianum* ist das gesamte entstandene [3^1-OH]-BChl frei oder nur sehr schwach gebunden und kann chromatographisch von der Antenne abgetrennt werden. Dadurch ist es möglich, auch aus diesem Bakterienstamm einen reinen p(850)-Komplex zu isolieren, der anders als bei den LH2-Komplexen aus *Rb. sphaeroides* und den beiden *Rps. acidophila*-Stämmen 7750 und 10050 durch Ansäuern nicht zugänglich war (Kapitel 4). Während aber bei dem p(850)- bzw. p(820)-Komplex aus beiden *Rps. acidophila* und aus *Rb. sphaeroides* die Carotinoide um wenige Nanometer blau-verschoben sind und die Q_x-Bande rot verschoben ist, ist bei p(850) aus *Rs. molischianum* eine Verschiebung der Carotinoide je nach Bande sowohl ins Rote als auch ins Blaue zu beobachten. Die Q_x-Bande zeigt hier eine Verschiebung ins Blaue. Im CD-Spektrum verschwindet die Doppelbande mit Maximum bei 796 nm und Minimum bei 810 nm und es bleibt eine breite Schulter übrig, die im Gegensatz zu den Komplexen aus *Rb. sphaeroides* und den beiden *Rps. acidophila*-Stämmen 7750 und 10050 ein positives Maximum aufweist. Bei dieser Schulter könnte es sich wieder um die obere Excitonenbande des BChl-850 handeln, die Koolhaas postulierte [Koolhaas et al. 1998] oder um Reste des BChl-B800, welche im Absorptionsspektrum in der kurzwelligen Flanke der 850 nm Bande untergehen. Es lässt sich aber auch bei dem p(850)-Komplex aus *Rs. molischianum* feststellen, dass das monomere BChl-B800 nur geringe Wechselwirkungen mit den Carotinoiden und dem BChl-B850 besitzt, wie es bereits in Kapitel 4.4 ausführlich diskutiert wurde.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Pigmente peripherer Antennenkomplexe verschiedener Purpurbakterien gezielt zu modifizieren und die spektroskopischen Eigenschaften der Produkte miteinander zu vergleichen. Dazu wurden periphere Lichtsammel-Komplexe B800-850 von drei verschiedenen Purpurbakterien ausgewählt (*Rb. sphaeroides*, *Rs. molischianum*, *Rps. acidophila* 10050), um selektive Pigmentmodifikationen vorzunehmen. Zusätzlich wurde die Schwachlicht- und Tieftemperatur-Modifikation von *Rps. acidophila* 7750, die einen B800-820-Komplex bildet, untersucht.

Die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften dieser unmodifizierten Antennen-Komplexe sind nahezu gleich, allerdings variieren die Q_y-Übergänge des BChl-B850 bzw. BChl-B820 von 817 nm (*Rps. acidophila* 7750) bis 858 nm (*Rps. acidophila* 10050). Die Q_y-Übergänge von *Rb. sphaeroides* (848 nm) und *Rs. molischianum* (847 nm) liegen dazwischen. In diesem Bereich und auch im Bereich des Q_y-Übergangs des BChl-B800 sind auch die CD-Muster bei den LH2 variabel.

Es ist bei den vier ausgewählten LH2-Komplexen möglich, wenn auch mit unterschiedlichen Methoden, einen sogenannten p(850)- bzw. p(820)-Komplex zu bilden, bei dem das BChl aus der B800-Bindungstasche vollständig entfernt ist. Dazu wurde bei der ersten Methode in Anlehnung an Bandilla [Bandilla et al. 1998] der pH-Wert des isolierten LH2-Komplexes aus *Rb. sphaeroides* erniedrigt. Dieses Verfahren wurde für die Antennen aus *Rb. sphaeroides* und *Rps. acidophila* 7750 bezüglich des geeigneten Detergens, der Antennenkonzentration, des pH-Wertes und der Inkubationstemperatur optimiert. Bei der Antenne aus *Rs. molischianum* war der p(850)-Komplex mit dieser Methode nicht zugänglich. Die Entfernung des BChl-B800 bedingt bei den selektierten Antennen eine Blauverschiebung im Bereich der Carotinoide und eine Rotverschiebung der Q_x- und Q_y-Banden des verbleibenden BChl-B850.

Bei der zweiten Methode werden die LH2-Komplexe mit $NaBH_4$ reduziert, dabei wird das BChl-B800 selektiv zu [3^1-OH]-BChl reduziert. In der Antenne aus *Rs. molischianum* ist dieses modifizierte Pigment nicht mehr an die Antenne gebunden. Es lässt sich chromatographisch vom Komplex abtrennen. Somit ist es möglich, auch von dem LH2-Komplex aus *Rs. molischianum* einen p(850)-Komplex zu bilden, bei dem das BChl-B800 vollständig entfernt ist.

In den Antennen aus *Rb. sphaeroides, Rps. acidophila* 7750 und 10050 ist im Gegensatz zum Komplex aus *Rs. molischianum* dieses durch $NaBH_4$-Reduktion erhaltene modifizierte

Pigment funktional an die Antenne gebunden, es trägt wesentlich zum Energietransfer zum BChl-B850 bei. Es lässt sich auch durch mehrmalige chromato-graphische Aufreinigung nicht vom Komplex abtrennen. Damit ist die Reduktion der peripheren Antenne mit Natriumborhydrid eine wertvolle, allerdings relativ begrenzte Alternative zur Darstellung von LH2 mit selektiv modifiziertem BChl in der B800-Bindungstasche.

BChl, das in der B800-Bindungstasche gebunden ist, reagiert also sensibler gegenüber Säure und $NaBH_4$-Behandlung, als das in der B850-Bindungstasche sitzende. Es kann festgestellt werden, dass sich in beiden Fällen die BChl-B800 und die BChl-B850 nahezu unabhängig voneinander verhalten. Sie zeigen nur geringe excitonische Kopplung, oder die geringfügigen Verschiebungen sind sogar durch leichte Strukturänderung bedingt.

Bandilla entwickelte ein Verfahren, mit dem es möglich ist, modifizierte Pigmente in die B800-Bindungstasche der peripheren Antenne aus *Rb. sphaeroides* einzubauen. Dies gelang ausgehend vom p(850)-Komplex durch pH-Erhöhung in Anwesenheit eines modifizierten (Bakterio)-Chlorophylls. Damit ließen sich aber nur Eintauschraten von maximal 50 % erzielen [Bandilla et al. 1998]. Diese Methode wurde bezüglich der Art des Detergens, der Antennen- und Pigmentkonzentration und der Inkubationstemperatur optimiert, so dass sich Rekonstitutionsraten je nach Pigment von bis zu 90 % verwirklichen ließen. Dabei ist die Wahl des Detergens von entscheidender Bedeutung. Es zeigte sich bei der Antenne aus *Rb. sphaeroides* eine Toleranz der BChl-B800-Bindungstasche gegenüber Änderungen im Bereich der Rings A, des isozyklischen Rings und des Zentralatoms. Auch ist der Einbau von Chlorinen möglich. Nur Pigmente ohne Zentralatom oder mit einer starken Verkürzung des veresterten Alkohols an Position 17^4 können nicht in die Bindungstasche eingebaut werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Methoden entwickelt werden, die eine Modifikation der Pigmente in peripheren Lichtsammelkomplexen erlauben. Die genaue Analyse und spektroskopische Untersuchung dieser so veränderten Antennen hat bereits jetzt dazu beigetragen, wichtige offene Fragen zur Struktur und Funktion von peripheren Antennenkomplexen aus Purpurbakterien zu beantworten. Dazu gehören (a) die Lokalisation der oberen excitonischen Bande des BChl-B850, (b) der Nachweis des ET-Mechanismus [Herek et al. 2000], (c) eine verbesserte theoretische Behandlung der CD-Spektren [Linnanto et al. 1999; Ihalainen et al. 2001], sowie (d) eine experimentelle Bestimmung der excitonischen Wechselwirkungen beim BChl-B850 über mehr als 13 Moleküle [Leupold et al. 1999]

8 LITERATUR

Alden R. G.; Johnson E.; Nagarajan V.; Parson W. W.; Law C. J.; Cogdell R. G. (1997) Calculations of spectroscopic properties of the LH2 bacteriochlorophyll-protein antenna complex from *Rhodopseudomonas acidophila*. J. Phys. Chem. B. 101: 4667-4680.

Allen J.P.; Feher G.; Yeates T.O.; Komiya H.; Rees D.C. (1987) Calculations of spectroscopic properties of the LH2 bacteriochlorophyll-protein antenna complex from *Rhodopseudomonas acidophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 5730-5734.

Andersson P. O.; Cogdell R. J.; Gillbro T. (1996) Femtosecond dynamics of carotenoid-to bacteriochlorophyll a energy transfer in the light-harvesting antenna complexes from the purple bacterium *Chromatium purpuratum*. Chem. Phys. 210: 195-217.

Ansorge W. (1985) Fast and sensitive detection of protein and DNA-bands by treatment with potassium permanganate. J. Biochim. Biophys. Methods. 11: 13-20.

Babcock G. T. (1993) Proteins, Radicals, Isotopes, and Mutants in Photosynthetic Oxygen Evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 10893-10895.

Bandilla M. (1995) Rekonstitution der Antennen B875 und B800-850 aus *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. mit Eintausch chemisch modifizierter (Bakterio-)Chlorophylle. Dissertation LMU München.

Bandilla M.; Ücker B.; Ram M.; Simonin I.; Gelhaye E.; McDermott G.; Cogdell R. J.; Scheer H. (1998) Reconstitution of the B800 bacteriochlorophylls in the peripheral light harvesting complex B800-850 of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 with BChl a and modified (bacterio-)chlorophylls. Biochim. Biophys. Acta. 1364: 390-402.

Barkigia K.M.; Fajer J. (1993) Models of photosynthetic chromophores: molecular structures of chlorins and bacteriochlorins. In: Deisenhofer J. and Norris R.J. (eds) The photosynthetic reaction center. Vol II pp. 513-539. Academic Press, New York.

Beese D.; Steiner R.; Scheer H.; Angerhofer A.; Robert B.; Lutz M. (1987) Chemically modified photosynthetic bacterial reaction centers:Circular dichroism, raman resonance, low temperature absorption,fluorescence and ODMR spectra and polypeptide composition of

borhydride treated reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides R26*. Photochem. Photobiol. 46: 293-304.

Braun P.; Scherz A. (1991) Polypeptides and Bacteriochlorophyll organization in the light harvesting complex B850 of *Rhodobacter sphaeroides* R-26.1. Biochemistry 30: 5177-5184.

Broglie R. M.; Hunter C. N.; Delepelaire P.; Niederman R. A.; Chua N.-H., Clayton R. K. (1980) Isolation and characterisation of the pigment-protein complexes of *Rhodopseudomonas sphaeroides* by lithium dodecyl sulfate / polyacrylamide gel electrophoresis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 87-91.

Brunisholz R. A.; Zuber H.; Valentine J.; Lindsay J. G.; Woolley K. J.; Cogdell R. J. (1986) The membrane location of the B890-complex from *Rhodosirillum rubrum* and the effect of carotenoid on the conformation of its two apoproteins exposed at the cytoplasmic surface. Biochim. Biophys. Acta. 849: 295-303.

Brunisholz R. A.; Zuber H. (1992) Structure, function and organisation of antenna polypeptides and antenna complexes from the three families of Rhodospirillaneae. J. Photochem. Photobiol. B - Biology. 15: 113-140.

Cantor C. R. Schimmel P.R. (1980) Techniques for the study of biological structure and function. In: Freeman W. H. (eds.) Biophysical Chemistry Part II. New York.

Chadwick B. W.; Zhang C.; Cogdell R. J.; Frank H. A. (1987) The effects of lithium dodecyl sulfate and sodium borohydride on the absorption spectrum of the B800-850 light-harvesting complex from *Rhodopseudomonas acidophila* 7750. Biochim. Biophys. Acta. 893: 444-451.

Chang M. C.; Callahan P. M.; Parkes-Loach P. S.; Cotton T. M.; Loach P. A. (1990) Spectroscopic characterization of the light-harvesting complex of *Rhodospirillum rubrum* and its structural subunit. Biochemistry. 29: 421-429.

Chang C.-H.; El-Kabbani O.; Tiede D.; Norris J.; Schiffer M. (1991) Structure of the membrane-bound protein photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*. Biochemistry 30: 5352-5360.

Clayton R. K.; Clayton B. J. (1981) B850 pigment-protein complex of *Rhodopseudomonas sphaeroides*: Extinction coefficients, circular dichroism, and the reversible binding of

bacteriochlorophyll. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 5583-5587.

Cogdell R. J.; Hipkins M. F.; MacDonald W.; Truscott T. G. (1981) Energy transfer between the Carotenoid and the Bacteriochlorophyll within the B800-850 light-harvesting pigment-protein complex of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Biochim. Biophys. Acta. 634: 191-202.

Cogdell R. J.; Scheer H. (1985) Circular dichroism of light-harvesting complexes from purple photosynthetic bacteria. Photochem. Photobiol. 42: 669-678.

Cogdell R. J.; Frank H. A. (1987) How Carotenoids function in photosynthetic bacteria. Biochim. Biophys. Acta. 895: 63-79.

Cogdell R.J.; Andersson P. O.; Gillbro T. (1992) Carotenoid singlet states and their involvement in photosynthetic light-harvesting pigments. J. Photochem. Photobiol. B - Biology. 15: 105-112.

Davidson E.; Cogdell R. J. (1981) Reconstitution of Carotenoids into the light-harvesting pigment-protein complex from the Carotenoidless mutant of *Rhodopseudomonas sphaeroides* R26. Biochim. Biophys. Acta. 635: 295-303.

Davis C. M.; Bustamante P. L.; Loach P. A. (1995) Reconstitution of the bacterial core light-harvesting complexes of *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodospirillum rubrum* with isolated alpha- and beta-polypeptides, bacteriochlorophyll alpha, and carotenoid. J. Biol. Chem. 270: 5793-5804.

Davis C. M.; Parkes-Loach P. S.; Cook C. K.; Meadows K. A.; Bandilla M.; Scheer H.; Loach P. A. (1996) Comparison of the structural requirements for bacteriochlorophyll binding in the core light-harvesting complexes of *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodobacter sphaeroides* using reconstitution methodology with bacteriochlorophyll analogs. Biochemistry 35: 3072-3084.

Deisenhofer J.; Michel H. (1993) Three-dimensional structure of the reaction center of *Rhodopseudomonas viridis*. In: Deisenhofer J.; Norris J. R. (eds.) The Photosynthetic Reaction Center. Vol. II pp. 541-558. Academic Press, New York.

Ditson S. L.; Davis R. C.; Pearlstein R. M. (1984) Relative enrichment of P-870 in photosynthetic reaction centres treated with sodium borohydride. Biochim. Biophys. Acta.

766: 623-629.

Donohue T.J.; Kaplan S. (1986) Synthesis and assembly of bacterial photosynthetic membranes. In: Staehelin L.A.; Arntzen C.J. Photosynthesis III: Photosynthetic membranes and light harvesting systems - Encyclopedia of plant physiology. pp. 632-639. Springer-Verlag, Berlin.

Eccles J.; Honig B. (1983) Charged amino-acids as spectroscopic determinants for chlorophyll in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 4959-4962.

Ermler U.; Fritzsch G.; Buchanan S. K.; Michel H. (1994) Structure of the photosynthetic reaction centre from *Rhodobacter sphaeroides* at 2.65 angstrom resolution: Cofactors and protein-cofactor interactions. Structure 2: 925-936.

Fiedor L.; Rosenbach-Belkin V.; Scherz A. (1992) The specific interaction between chlorophylls and chorophyllase. J. Biol. Chem. 267: 22043-22047.

Fowler G. J. S.; Visschers R. W.; Grief G. G.; van Grondelle R.; Hunter C.N. (1992) Genetically modified photosynthetic antenna complexes with blueshifted absorbance bands. Nature 355: 848-850.

Fowler G. J. S.; Crielaard W.; Visschers R. W.; van Grondelle R.; Hunter C. N. (1993) Site-directed mutagenesis of the LH2 light-harvesting complex of *Rhodobacter-Sphaeroides* - changing betalys23 to Gln results in a shift in the 850 nm absorption peak. Photochem. Photobiol. 57: 2-5.

Fowler G. J. S.; Sockalingum G. D.; Robert B.; Hunter N. C. (1994) Blue shifts in bacteriochlorophyll absorbance correlate with changed hydrogen bonding patterns in light harvesting 2 mutants of *Rhodobacter sphaeroides* with alterations at a-Tyr-44 and a-Tyr-45. Biochem. J. 299: 695-700.

Fowler G. J. S.; Hess S.; Pullerits T.; Sundstrom V.; Hunter C. N. (1997) The role of beta Arg(-10) in the B800 bacteriochlorophyll and carotenoid pigment environment within the light-harvesting LH2 complex of *Rhodobacter sphaeroides*. Biochemistry 36: 11282-11291.

Frank H. A.; Farhoosh R.; Aldema M. L.; Decoster B.; Christensen R. L.; Gebhard R.; Lugtenburg J. (1993 a) Carotenoid-to-Bacteriochlorophyll Singlet Energy Transfer in Carotenoid-Incorporated B850 Light-Harvesting Complexes of *Rhodobacter sphaeroides* R-26.1. Photochem. Photobiol. 57: 49-55.

Frank H. A.; Chynwat V.; Hartwich G.; Meyer M.; Katheder I.; Scheer H. (1993 b) Carotenoid triplet state formation in *Rhodobacter sphaeroides R26* reaction centers exchanged with modified bacteriochlorophyll pigments and reconstituted with spheroidene. Photosyn. Res. 37: 193-203.

Frank H. A.; Young A. J.; Britton G.; Cogdell R. J. (1999) The photochemistry of carotenoids. Kluwer, Dordrecht.

Fraser N. J.; Dominy P. J.; Ücker B.; Simonin I.; Scheer H.; Cogdell R. J. (1999) Selective release, removal and reconstitution of BChla molecules into the B800 sites of LH2 complexes from *Rhodopseudomonas acidophila* 10050. Biochemistry 38: 9684-9692.

Freer A.; Prince S.; Sauer K.; Papiz M.; Hawthornthwaitelawless A.; Mcdermott G.; Cogdell R.; Isaacs N. W. (1996). Pigment-pigment interactions and energy transfer in the antenna complex of the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas acidophila*. Structure 4: 449-462.

Gall A.; Fowler G. J. S.; Hunter C. N.; Robert, B. (1997) Influence of the protein binding site on the absorption properties of the monomeric bacteriochlorophyll in *Rhodobacter sphaeroides* LH2 complex. Biochemistry 36: 16282-16287.

Gall A.; Fraser N. J.; Bellissent-Funel M.; Scheer H.; Robert B.; Cogdell R. (1999) Bacteriochlorin-protein interactions in native B800-850, B800 deficient and B800-BChl *a*(p) reconstituted complexes from *Rhodopseudomonas acidophila*, strain 10050. FEBS Lett. 449: 269-272.

Gardiner A. T.; Cogdell R. J.; Takaichi S. (1993) The effect of growth conditions on the light-harvesting apparatus in *Rhodopseudomonas acidophila*. Photosyn. Res. 38: 159-167.

Germeroth L.; Lottspeich F.; Robert B.; Michel H. (1993) Unexpected similarities of the B800-850 light-harvesting complex from *Rhodospirillum molischianum* to the B870 light-harvesting complex from other purple photosynthetic bacteria. Biochemistry 32: 5615-5621.

Ghosh R.; Bachofen R.; Hauser H. (1984) Structural changes accompanying the reversible oxidation of the chromophore membrane from *Rhodospirillum rubrum* G 9. Biochim. Biophys. Acta. 765: 97-105.

Gillbro T.; Cogdell R. J. (1989) Carotenoid Fluorescence. Chem. Phys. Lett. 158: 312-316.

Goedheer J.C. (1959) Energy transfer between carotenoids and bacteriochlorophyll in chromatophores of purple bacteria. Biochim. Biophys. Acta. 35: 1-8.

Goodwin M. G.; Jackson B. J. (1993) Electrochromic responses of carotenoid absorbance bands in purified light-harvesting complexes from *Rhodobacter capsulatus* reconstituted into liposomes. Biochim. Biophys. Acta 1144: 191-198.

Gudowska-Nowak E.; Newton M. D.; Fajer J. (1990) Conformational and environmental effects on bacteriochlorophyll optical spectra: Correlations of calculated spectra with structural results. J. Phys. Chem. 94: 5795-5801.

Hanson L. K. (1991) Molecular orbital theory of monomer pigments. In: Scheer H. Chlorophylls. pp. 993-1014. CRC Press, Boca Raton.

Hartwich G. (1994) Dynamic des Elektrontransfers in Reaktionszentren photosynthetischer Bakterien; Beeinflussung durch gezielten Pigmentaustausch. Dissertation, Technische Universität, München.

Hartwich G.; Scheer H.; Aust V.; Angerhofer A. (1995) Absorption and ADMR studies on bacterial photosynthetic reaction centres with modified pigments. Biochim. Biophys. Acta. 1230: 97-113.

Hayashi H.; Noguchi T.; Tasumi M. (1989) Studies on the interrelationship among the intensity of a raman marker band of carotenoids, polyene chain structure and efficiency of the energy transfer from photosynthetic bacteria. Photochem. Photobiol. 49: 337-343.

Helfrich M.; Schoch S.; Lempert U.; Cmiel E.; Rüdiger W. (1994) Chlorophyll synthetase cannot synthesize chlorophyll a'. Eur. J. Biochem. 219: 267-275.

Helfrich M.; Schoch S.; Schafer W.; Ryberg M., and Rüdiger W. (1996) Absolute configuration of protochlorophyllide alpha and substrate specificity of NADPH-

protochlorophyllide oxidoreductase. J. Am. Chem. Soc. 118: 2606-2611.

Herek J. L.; Fraser N. J.; Pullerits T.; Martinsson P.; Polvika T.; Scheer H.; Cogdell R. J.; Sundström V. (2000) Mechanism of B800->B850 energy transfer mechanism in bacterial LH2 complexes investigated by B800 pigment exchange. Biophys. J. 78: 2590-2596.

Hofmann E.; Wrench P. M.; Sharples F. P.; Hiller R. G.; Welte W.; Diederichs K. (1996) Structural basis of light harvesting by carotenoids: Peridinin-chlorophyll-protein from *Amphidinium carterae*. Science 272: 1788-1791.

Hu X.; Ritz T.; Damjanovic A. Autenrieth F.; Schulten K. (2002) Photosynthetic apparatus of purple bacteria. Quart. Rev. Biophys. 35: 1-62.

Huber R. (1989) Eine strukturelle Grundlage für die Übertragung von Lichtenergie und Elektronen in der Bologie (Nobel-Vortrag). Angew. Chem. 101: 849-871.

Hunter C. N.; Fowler G. J. S.; Grief G. G.; Olsen J. D.; Jones M. R. (1993) Protein engineering of bacterial light-harvesting complexes. Biochem. Soc. Transactions. 21: 41-43.

Hunter C. N.; Hundle B. S.; Hearst J. E.; Lang P.; Gardiner A. T.; Takaichi S.; Cogdell R. J. (1994) Introduction of new carotenoids into the bacterial photosynthetic apparatus by combining the carotenoid biosynthetic pathways of *Erwina herbicola* and *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bacteriol. 176: 3692-3697.

Hunter C. N. (1995) Genetic manipulation of the antenna complexes of purple bacteria. In: Blankenship R. E.; Madigan M. T.; Bauer C. E. Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. pp. 473-501. Kluwer Academic Publisher, Netherlands.

Ihalainen J. A., Linnanto J., van Stokkum I. H. M., Myllyperkio P., Kallioinen J., Ücker B., Scheer H., Korppi-Tommola J. E. I. (2001) Energy transfer in LH2 of *Rhodospirillum molischianum* studied by subpicosecond spectroscopy and configuration interaction exciton calculations. J. Phys. Chem. B. 105: 9849-9856.

Imhoff J. F. (1983) *Rhodopseudomonas marina* sp.-nov, a new marine phototrophic purple bacterium. System. Appl. Microbiol. 4: 512-521.

Imhoff J. F.; Trüper H. G. (1981) Ectothiorhodospira abdelmalekii sp. nov., a new halophilic alkaliphilic phototrophic bacterium. Zent. Bl. Bakteriol. Parasitenkd. Infekt.Krankh. Hyg. Bakt. I Corg. C1: 61-69.

Imhoff J. F.; Trüper H. G.; Pfennig N. (1984) Rearrangement of the species and genera of the phototrophic purple nonsulfur bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 34: 340-343.

Iwata K.; Hayashi H.; Tasumi M. (1985) Resonance raman studies of the conformations of all-trans carotenoids in light harvesting systems of photosynthetic bacteria. Biochim. Biophys. Acta. 810: 269-273.

Jentzen W.; Simpson M. C.; Hobbs J. D.; Song X.; Ema T.; Nelson N. Y.; Medforth C. J.; Smith K.M.; Veyrat M.; Mazzanti M.; Ramasseul R.; Marchon J.C.; Takeuchi T.; Goddard W.A.; Shellnutt J. A. (1995) Ruffling in series of Nickel(II) meso-tetrasubstituted Porphyrins as a model for the conserved ruffling of the Heme of Cytochrome c. J. Am. Chem. Soc. 117: 11085-11097.

Karrasch S.; Bullough P. A.; Ghosh R. (1995) The 8.5 angstrom projection map of the light-harvesting complex I from *Rhodospirillum rubrum* reveals a ring composed of 16 subunits. EMBO J. 14: 631-638.

Kasha M.; Rawls H. R.; El-Bayoumi M. (1965) Exciton model in molecular spectroscopy. Pure Appl. Chem. 11: 371.

Kingma H.; van Grondelle R.; Duysens, L. N. M. (1985) Magnetic-field effects in photosynthetic bacteria I. Magnetic-field-induced bacteriachlorophyll emission changes in the reaction center and the antenna of *Rhodospirillum rubrum, Rhodopseudomonas sphaeroides*, *Prosthecochloris aestuarii*. Biochim. Biophys. Acta 808: 363-382.

Koepke J.; Hu X. C.; Muenke C.; Schulten K.; Michel H. (1996) The crystal structure of the light-harvesting complex II (B800-850) from *Rhodospirillum molischianum*. Structure 4: 581-597.

Koolhaas M. H. C.; Frese R. N.; Fowler G. J. S.; Bibby T. S.; Georgakopoulou S.; van der Zwan G.; Hunter C. N.; van Grondelle R. (1998) Identification of the upper exciton component of the B850 bacteriochlorophylls of the LH2 antenna complex, using a B800-Free mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. Biochemistry 37: 4693-4698.

Koolhaas M. H. C.; van der Zwan G.; Frese R. N.; van Grondelle R. (1997) Red shift of the

zero crossing in the CD spectra of the LH2 antenna complex of *Rhodopseudomonas acidophila*: A structure-based study. J. Phys. Chem. B. 101: 7262-7270.

Koyama Y. (1991) Structures and functions of Carotenoids in photosynthetic systems. J. Photochem. Photobiol. B. 9: 265-280.

Kramer H. J. M.; van Grondelle R.; Hunter C. N.; Westerhuis W. H. J.; Amesz J. (1984 a) Pigment organisation of the B800-850 antenna complexes of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Biochim. Biophys. Acta 765: 156-165.

Kramer H. J M.; Pennoyer J. D.; van Grondelle R.; Westerhuis W. H. J.; Niederman R. A.; Amesz J. (1984 b) Low-temperature optical properties and pigment organization of the B875 light-harvesting Bacteriochlorophyll-protein complex of purple photosynthetic bacteria. Biochim. Biophys. Acta. 767: 335-344.

Kühlbrandt W. (1995) Photosynthesis - Many wheels make light work. Nature 374: 497-498.

Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Lang H. P.; Hunter C. N. (1994) The Relationship Between Carotenoid Biosynthesis and the Assembly of the Light-Harvesting LH2 Complex in *Rhodobacter sphaeroides*. Biochem. J. 298: 197-205.

Leupold D.; Stiel H.; Ehlert J.; Nowak F.; Teuchner K.; Voigt B.; Bandilla M.; Ücker B.; Scheer H. (1999) Photophysical characterization of the B800-depleted light harvesting complex B850 of *Rhodobacter sphaeroides* implications to the ultrafast energy transfer 800 to 850 nm. Chem. Phys. Lett. 301: 537-545.

Linnanto J.; Korppi-Tommola J. E. I.; Helenius V. M. (1999) Electronic states, absorption spectrum and circular dichroism spectrum of the photosynthetic bacterial LH2 antenna of *Rhodopseudomonas acidophila* as predicted by exciton theory and semiempirical calculations. J. Phys. Chem. 103: 8739-8750.

Loach P. A.; Parkes-Loach P. S.; Davis C. M.; Heller B. A. (1994) Probing protein structural

requirements for formation of the core light-harvesting complex of photosynthetic bacteria using hybrid reconstitution methodology. Photosynth. Res. 40: 231-245.

Lozano R. M., Fernandez-Cabrera C., Ramirez J. M. (1990) The contribution of the carotenoid to the visible circular dichroism of the light-harvesting antenna of *Rhodospirillum rubrum*. Biochem. J. 270: 469-472.

Mäntele W. (1990) Photosynthese. Biologie in unserer Zeit 285-293.

Malik K. A. (1984) A new method for liquid nitrogen storage of phototrophic bacteria under anaerobic conditiones. J. Microbiol. Meth. 2: 41-47.

Maroti P.; Kirmaier C.; Wraight C.; Holten D.; Pearlstein R. M. (1985) Photochemistry and electron-transfer in Borohydride-treated photosynthetic reaction centers. Biochim. Biophys. Acta. 810: 132-139.

Mc Luskey K.; Prince S. M.; Cogdell R. J.; Isaacs N.W. (2001) The crystallographic structure of the B800-820 LH3 light-harvesting complex from the purple bacteria *Rhodopseudomonas acidophila* strain 7050. Biochemistry 40: 8783-8789.

McDermott G.; Prince S. M.; Freer A. A.; Hawthornthwaitelawless A. M.; Papiz M. Z.; Cogdell R. J.; Isaacs N. W. (1995) Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria. Nature 374: 517-521.

Meyer M.; Scheer H. (1995). Reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* R26 containing C-3 acetyl and vinyl (bacterio)pheophytins at sites H-A,H-B. Photosynth. Res. 44: 55-65.

Miller J. F.; Hinchigeri S. B.; Parkes-Loach P. S.; Callahan P. M.; Sprinkle J. R.; Riccobono J. R.; Loach, P. A. (1987) Isolation and characterization of a subunit form of the light-harvesting complex of *Rhodospirillum rubrum.* Biochemistry 26: 5055-5062.

Mimuro M.; Nagashima U.; Nagaoka S.; Nishimura Y.; Takaichi S.; Katoh T.; Yamazaki I. (1992) Quantitative analysis of the solvent effect on the relaxation processes of carotenoids showing dual emissive characteristics. Chem. Phys. Lett. 191: 219-224.

Nagarajan V.; Alden R. G.; Williams J. C.; Parson W. W. (1996). Ultrafast exciton relaxation in the B850 antenna complex of *Rhodobacter sphaeroides*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 13774-13779.

Noguchi T.; Hayashi H.; Tasumi M. (1990) Factors controlling the efficiency of energy transfer from carotenoids of bacteriochlorophyll in purple photosynthetic bacteria. Biochim. Biophys. Acta. 1017: 280-290.

Olsen J. D.; Hunter C. N. (1994) Protein structure modelling of the bacterial light-harvesting complex. Photochem. Photobiol. 60: 521-535.

Omata T.; Murata N. (1983) Preparation of Chlorophyll a, Chlorophyll b and Bacteriochlorophyll a by column chromatography with DEAE-Sepharose Cl-6B and Sepharose Cl-6B. Plant Cell Physiol. 24: 1093-1100.

Paulsen H. (1995) Chlorophyll a/b-binding proteins. Photochem. Photobiol. 62: 367-382.

Pearlstein R. M. (1991) Theoretical interpretation of antenna spectra. In: Scheer H. Chlorophylls. pp. 1047-1078. CRC Press, Boca Raton.

Pfennig, N. (1969) *Rhodopseudomonas acidophila*, sp. n., a new species of the budding purple nonsulfur bacteria. J. Bacteriol. 99: 597-602.

Prince S. M.; Papiz M. Z.; Freer A. A.; McDermott G.; Hawthornthwaitelawless A. M.; Cogdell R. J.; Isaacs N. W. (1997) Apoprotein structure in the LH2 complex from *Rhodopseudomonas acidophila* strain 10050: Modular assembly and protein pigment interactions. J. Mol. Biol. 268: 412-423.

Pullerits T.; Hess S.; Herek J. L.; Sundstrom V. (1997) Temperature dependence of excitation transfer in LH2 of *Rhodobacter sphaeroides*. J. Phys. Chem. B. 101: 10560-10567.

Remsen C. C.; Clayton R. K.; Clayton W. R. (1982) The Photosynthetic Bacteria. pp. 31-60. Plenum Press, New York.

Robert B.; Lutz M. (1985) Structures of antenna complexes of several Rhodospirillales from their resonance raman spectra. Biochim. Biophys. Acta. 807: 10-23.

Rosenbach-Belkin V. (1988) Dissertation. Weizmann Institute of Science, Rehovot.

Sauer K.; Austin L. A. (1978) Bacteriochlorophyll-protein complexes from light-harvesting antenna system of photosynthetic bacteria. Biochemistry. 17: 2011-2019.

Sauer K., Scheer H., Sauer P. (1987) Förster transfer calculations based on crystal structure data from *Agmenellum quadruplicatum* C-phycocyanin. *Photochem. Photobiol.* 46: 427-440.

Sauer K.; Cogdell R. J.; Prince S. M.; Freer A.; Isaacs N. W.; Scheer H. (1996) Structure-based calculations of the optical spectra of the LH2 bacteriochlorophyll-protein complex from *Rhodopseudomonas acidophila*. Photochem. Photobiol. 64: 564-576.

Schägger H.; von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 166: 368-379.

Scheer H.; Gross E.; Nitsche B.; Cmiel E.; Schneider S.; Schäfer W.; Schiebel H.M.; Schulten H.R. (1986) Structure of methylpheophorbide-RCI. Photochem. Photobiol. 43: 559-571.

Scheer H.; Hartwich G. (1995) Bacterial reaction centers with modified tetrapyrrole chromophores. In: Blankenship R. E.; Madigan M. T.; Bauer C.E. (eds) Anoxygenic photosynthetic bacteria. pp. 649-663. Kluwer, Dodrecht.

Scheer H.; Struck A. (1993) Bacterial reaction centers with modified tetrapyrrole chromophores. In: Deisenhofer J.; Norris J. R. (eds) The Photosynthetic Reaction center. pp. 157-192. Academic Press, New York.

Scherz A.; Parson W. W. (1984) Exciton Interaction in dimers of bacteriochlorophyll and related molecules. Biochim. Biophys. Acta. 766: 666-678.

Scherz A.; Parson W. W. (1986) Interactions of the bacteriochlorophylls in antenna bacteriochlorophyll-protein complexes of photosynthetic bacteria. Photosynth. Res. 9: 21-32.

Scherz A.; Rosenbach-Belkin V. (1989) Comparative study of optical absorption and circular dichroism of bacteriochlorophyll oligomers in Triton X-100, the antenna pigment B850, and the primary donor P-860 of photosynthetic bacteria indicates that all are similar dimers of bacteriochlorophyll a. Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 1505-1509.

Schwerzmann R. U.; Bachofen R. (1989) Carotenoid profiles in pigment-protein complexes of *Rhodospirillum rubrum*. Plant Cell Physiol. 30: 497-504.

Senge M.O. (1992) The conformational flexibility of tetrapyrroles - current model studies and photobiological relevance. J. Photochem. Photobiol. B 16: 3-36.

Shkuropatov A. Y.; Khatypov R. A.; Volshchukova T. S.; Shkuropatova V. A.; Owens T. G.; Shuvalov V. A. (1997) Spectral and photochemical properties of borohydride-treated D1-D2-cytochrome b-559 complex of photosystem II. FEBS. Lett. 420: 171-174.

Shreve A. P.; Trautman J. K.; Frank H. A.; Owens T. G.; Albrecht A. C. (1991) Femtosecond energy-transfer processes in the B800-850 light-harvesting complex of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. Biochim. Biophys. Acta. 1058: 280-288.

Siefermann-Harms D. (1987) The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. Physiol. Plant. 69: 561-568.

Sistrom W.R. (1978) Control of antenna pigment components. In: Clayton R.K.; Sistrom W.R. (eds.) The Photosynthetic Bacteria. pp. 841-848. Plenum Press, New York.

Smith J. R. L.; Calvin M. (1966) Studies on the chemical and photochemical oxidation of bacteriochlorophyll. J. Am. Chem. Soc. 88: 4500-4506.

Stackenbrandt E.; Embley M.; Weckesser J. (1988) In: Olson J. M.; Ormerod J. G.; Amesz J.; Stackenbrandt E.; Trüper H. G. Photosynthetic Bacteria. pp. 201-215. Plenum Press, New York.

Struck A. (1991) Chemisch modifizierte Bakteriochlorophylle und -pheophytine in den Bindungsstellen $B_{A,B}$ und $H_{A,B}$ von photosynthetischen Reaktionszentren aus *Rb. sphaeroides* R26: Pigmentsynthese, Pigmentaustausch und Spektroskopie. Dissertation. LMU, München.

Struck A.; Müller A.; Scheer H. (1991) Modified bacterial reaction centers. 4. The borohydride treatment reinvestigated: comparison with selective exchange experiments at binding sites Ba,b and Ha,b. Biochim. Biophys. Acta 1060: 262-270.

Sturgis J. N.; Hagemann G.; Tadros M. H.; Robert B. (1995). Biochemical and spectroscopic characterization of the B800-850 light-harvesting complex from *Rhodobacter sulphidophilus* and its B800-830 spectral form. Biochemistry 34: 10519-10524.

Theiler R.; Suter F.; Zuber H.; Cogdell R. J. (1984) A comparison of the primary structures of the two B800-850 apoproteins from wild-type *Rhodopseudomonas sphaeroides* strain 2.4.1 and a carotenoidless mutant strain R26.1. FEBS Lett. 175: 231-237.

Thornber J. P. (1986) Biochemical characterisation and structure of pigment-proteins of photosynthetic organism. In: Staehelin L. A.; Antzen C. J. (eds) Photosynthesis III: Photosynthetic membranes and light harvesting systems. pp. 98-142. Springer Verlag Berlin.

Trissl H. W. (1993) Long-wavelength absorbing antenna pigments and heterogeneous absorbtion bands concentrate excitons and increase absorption cross section. Photosynth. Res. 35: 247-263.

Tronrud D. E.; Matthews B. W. (1993) Refinement of the structure of a water soluble complex from green photosynthetic bacteria by incorporation of the chemically determined amino acid sequence. In: Deisenhofer, J. and Norris, J. R. The photosynthetic reaction center. Vol. I pp. 13-22. Academic Press, New York.

van Grondelle R.; Dekker J. P.; Gillbro T.; Sundstroem V. (1994) Energy transfer and trapping in photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta 118: 71-65.

Visschers R. W.; Chang M. C.; van Mourik F.; Parkes-Loach P. S.; Heller B. A.; Loach P. A.; van Grondelle R. (1991) Fluorescence polarization and low-temperature absorption spectroscopy of a subunit form of light-harvesting complex I from purple photosynthetic bacteria. Biochemistry 30: 5734-5742.

Visschers R. W.; Crielaard W.; Fowler G. J. S.; Hunter C. N.; van Grondelle R. (1994) Probing the B800 bacteriochlorophyll binding site of the accessory light-harvesting complex from *Rhodobacter sphaeroides* using site-directed mutants .2. A low-temperature spectroscopy study of structural aspects of the pigment-protein conformation. Biochim. Biophys. Acta 1183: 483-490.

Visschers R. W.; Germeroth L.; Michel H.; Monshouwer R.; van Grondelle R. (1995) Spectroscopic properties of the light-harvesting complexes from *Rhodospirillum molischianum*. Biochim. Biophys. Acta 1230: 147-154.

Wasielewski M. R.; Kispert L.D. (1986) Direct measurement of the lowest excited singlet state lifetime of all-trans-ß-Carotene and related carotenoids. Chem Phys Lett. 128: 238-243.

Wasielewski M. R.; Liddell P.A.; Barrett D.; Moore T.A.; Gust D. (1986) Ultrafast carotenoid to pheophorbide energy transfer in a biomimetic model for antenna function in photosynthesis. Nature 322: 570-572.

Wasielewski M. R. (1992) Photoinduced electron transfer in supramolecular systems for artificial photosynthesis. Chem. Rev. 92: 435-461.

Webster G. D.; Cogdell R. J.; Lindsay G. J. (1980) The location of the carotenoid in the B800-850 light-harvesting pigment protein complex from *Rhodopseudomonas capsulata*. FEBS Lett. 391-394.

Wiemken V.; Bachofen R. (1985) Different accessibility of the membrane surfaces of isolated chromatophores from the wild-type and the carotenoidless mutant R26.2 of *Rhodopseudomonas sphaeroides* to proteolytic enzymes and membrane markers. Physiol. Veget. 23: 789-800.

Woese C. R.; Schleifer K. H.; Stackenbrandt E. (1985) Evolution of Prokaryotes. pp. 1-30. Academic Press, London.

Wu H. M.; Ratsep M.; Jankowiak R.; Cogdell R. J.; Small G. J. (1997) Comparison of the LH2 antenna complexes of *Rhodopseudomonas acidophila* (strain 10050) and *Rhodobacter sphaeroides* by high-pressure absorption, high-pressure hole burning, and temperature-dependent absorption spectroscopies. J. Phys. Chem. B. 101: 7641-7653.

Yurkov V. V.; van Gemerden H. (1993) Impact of Light/Dark Regimen on Growth Rate, Biomass Formation and Bacteriochlorophyll Synthesis in *Erythromicrobium hydrolyticum*. Arch. Microbiol. 159: 84-89.

Zuber H.; Brunisholz R. A. (1991) Structure and function of antenna polypeptides and Chlorophyll-protein complexes: Principles and variability. In: Scheer H. (eds.) Chlorophylls. pp. 627-704. CRC-Press, Boca Raton.

Zuber H. (1993) Structural features of photosynthetic light-harvesting systems. In: Deisenhofer J.; Norris J. R. (eds.) The photosynthetic reaction center. Vol 1. pp. 43-100. Academic Press, New York.

Zuber H.; Cogdell R. J. (1995) Structure and organisation of purple bacterial antenna

complexes. In: Blankenship R. E.; Madigan M. T.; Bauer C. E. (eds.) Anoxygenic photosynthetic bacteria. pp. 315-348. Kluwer, Dordrecht.

Zurdo J., Lozano R. M., Fernandez-Cabrera C., Ramirez J.M. (1991) Dimeric carotenoid interaction in the light-harvesting antenna of purple phototrophic bacteria. Biochem. J. 274: 881-884.

Zurdo J.; Fernandez-Cabrera C.; Ramirez J. M. A (1993) Structural Role of the Carotenoid in the Light-Harvesting II-Protein of *Rhodobacter-Capsulatus*. Biochem. J. 290: 531-537.

LEBENSLAUF

Zur Person

Beate Ücker

geboren am 19.03.1967 in Seefeld

Schulbildung

1973 – 1977	Grundschule Seefeld
1977 – 1985	Gymnasium Gilching
1985 - 1987	Max-Born-Gymnasium in Germering
26.06.1987	*Abschluss: Allgemeine Hochschulreife*

Studium

11/1987 - 08/1994	Studium Chemie (Dipl.) an der LMU München
01/1994 - 08/1994	Diplomarbeit am Botanischen Institut der LMU München unter der Anleitung von Professor Dr. W. Rüdiger
22.08.1994	*Abschluss als Diplom-Chemikerin*
10/1994 - 09/1999	Dissertation am Botanischen Institut der LMU München unter der Anleitung von Professor Dr. H. Scheer

Beschäftigung

10/1999 - 09/2000	Pharmaberaterin bei Pharmexx Sales & Marketing Intelligence GmbH
10/2000 – 08/2002	Pharmaberaterin bei GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG
seit 09.2002	Pharmaberaterin bei Aventis Pharma Deutschland GmbH