

[29] S. O. Hoch, *J. Biol. Chem.* 248, 2992 (1973).

[30] S. O. Hoch u. I. P. Crawford, *J. Bacteriol.* 116, 685 (1973).

[31] K. Sakaguchi, *Biochem. Biophys. Acta* 220, 580 (1970).

[32] J. Ito, *Nature* 223, 57 (1969).

[33] S. F. Queener u. J. C. Gunsalus, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 67, 1225 (1970).

[34] F. Rohr u. W. L. Betsch, *Biochem. Biophys. Acta* 285, 243 (1972).

[35] N. Patel, W. M. Holmes u. J. F. Kane, *J. Bacteriol.* 114, 600 (1973).

[36] R. V. Savula u. I. P. Crawford, *J. Biol. Chem.* 248, 3573 (1973).

[37] G. A. O'Donovan, H. Holoubek u. J. C. Gerhart, *Nature New Biol.* 238, 264 (1973).

[38] A. E. Herner u. A. Riggs, *Nature* 198, 35 (1963).

[39] A. Riggs u. A. E. Herner, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 48, 1664 (1962).

[40] M. Chamberlin, J. McGrath u. L. Waskell, *Nature* 228, 227 (1970).

[41] J. J. Dunn, F. A. Bautz u. E. K. F. Bautz, *Nature New Biol.* 230, 94 (1971).

[42] H. C. Towle, J. F. Jolly u. J. A. Boezi, *J. Biol. Chem.* 250, 1723 (1975).

[43] H. Kuntzel u. K. P. Schäfer, *Nature New Biol.* 231, 265 (1971).

[44] M. J. Chamberlin in P. D. Boyer: *The Enzymes*. 3. Aufl., Vol. 10. Academic Press, New York 1974, S. 333ff.

[45] U. I. Lill, E. M. Behrendt u. G. R. Hartmann, *Eur. J. Biochem.* 52, 411 (1975).

[45a] C. Leib u. G. R. Hartmann, unveröffentlicht.

[46] U. I. Lill, E. M. Behrendt u. G. R. Hartmann, unveröffentlicht.

[47] A. Heil u. W. Zillig, *FEBS Lett.* 11, 165 (1970).

[48] H. R. Whiteley u. H. E. Hemphill, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 647 (1970).

[49] V. G. Nikiforov, *FEBS Lett.* 16, 74 (1971).

[50] R. G. Shorestein u. R. Losick, *J. Biol. Chem.* 248, 6170 (1973).

[51] B. Rexer, V. R. Srinivasan u. W. Zillig, *Eur. J. Biochem.* 53, 271 (1975).

[52] E. Domingo, C. Escarmis u. R. C. Warner, *J. Biol. Chem.* 250, 2866 (1975).

[53] S. J. Surzycki, persönliche Mitteilung (1975).

[54] M. Takeda u. F. Lipmann, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 56, 1875 (1966).

[55] K. Higo, W. Held, L. Kahan u. M. Nomura, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 944 (1973).

[56] W. A. Held, W. R. Gette u. M. Nomura, *Biochemistry* 13, 2115 (1974).

[57] M. L. Goldberg u. J. Argetsinger-Stevitz, *Biochemistry* 13, 2123 (1974).

[58] M. Nomura, P. Traub u. H. Bechmann, *Nature* 219, 793 (1968).

[59] J. Lucas-Lenard u. F. Lipmann, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 55, 1562 (1966).

[60] J. Gordon, M. Schweiger, I. Krisko u. C. A. Williams, *J. Bacteriol.* 109, 1 (1969).

[61] I. Ciferri, B. Parisi, A. Perani u. M. Grandi, *J. Mol. Biol.* 37, 529 (1968).

[62] B. Parisi, G. Milanesi, J. L. van Etten, A. Perani u. O. Ciferri, *J. Mol. Biol.* 28, 295 (1967).

[63] L. Felicetti u. F. Lipmann, *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 548 (1968).

[64] I. Krisko, J. Gordon u. F. Lipmann, *J. Biol. Chem.* 244, 6117 (1969).

[65] R. D. Simoni, R. S. Cridle u. P. K. Stumpf, *J. Biol. Chem.* 242, 573 (1967).

[66] W. Lehman, *Nature* 255, 424 (1975).

[67] R. Y. Stanier, M. Doudoroff u. E. A. Adelberg: *The Microbial World*. 2. Aufl. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1963, S. 65ff.

[68] H. A. Klein u. S. Ochoa, *J. Biol. Chem.* 247, 8122 (1972).

[69] J. Si, N.-H. Chua, Y. Ogawa u. F. Lipmann, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56, 611 (1974).

[70] D. Richter u. W. Möller in D. Richter: *Lipmann Symposium: Energy, Regulation and Biosynthesis in Molecular Biology*. de Gruyter, Berlin 1974, S. 524.

[71] G. Stöffler, I. G. Wool, A. Lin u. K. H. Rak, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 4723 (1974).

[72] L. W. Fleming u. J. D. Duerksen, *J. Bacteriol.* 93, 142 (1967).

[73] F. H. Ruddle, *Adv. Hum. Genet.* 3, 173 (1973).

[74] J. Schwaber u. E. P. Cohen, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 2203 (1974).

[75] C. A. Wright: *Biochemical and Immunological Taxonomy of Animals*. Academic Press, New York 1974.

[76] G. Buse, S. Braig u. G. Braunitzer, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 350, 1686 (1969).

[77] R. Huber, O. Epp u. H. Formanek, *J. Mol. Biol.* 42, 591 (1969).

[78] M. F. Perutz u. H. Raidl, *Nature* 255, 256 (1975).

[79] M. Bühner, G. C. Ford, D. Moras, K. W. Olson u. M. Rossmann, *J. Mol. Biol.* 90, 25 (1974).

[80] R. E. Dickerson u. I. Geis: *Struktur und Funktion der Proteine*. Verlag Chemie, Weinheim 1971.

Zur Biosynthese der Purpurnembran von Halobakterien

Von Manfred Sumper, Heribert Reitmeier und Dieter Oesterhelt^[*]

Professor Feodor Lynen zum 65. Geburtstag gewidmet

Halobakterien sind extrem spezialisierte Organismen. Sie leben nur in gesättigten Kochsalzlösungen. In der Zellmembran dieser Bakterien sind insel förmige Membranbereiche nachweisbar, die sich durch Membranfraktionierung isolieren lassen. Diese Bereiche bestehen aus einer Lipidmatrix, in die Bacteriorhodopsinmoleküle in hexagonal-kristalliner Anordnung eingelagert sind. Bacteriorhodopsin ist ein tiefpurpurfarbener Retinal-Protein-Komplex („Purpurnembran“). Die Purpurnembran funktioniert als Licht-Energie-Wandler. – Wie kann ein solcher differenzierter Membranbereich entstehen? Bei in-vivo-Versuchen zur Biosynthese der Purpurnembran erwies sich eine andere Zellmembranfraktion, die Braune Membran, als biosynthetische Vorstufe. Bacteriorhodopsin (das retinal-freie Protein) wird zunächst in die Braune Membran eingebaut und kann erst nach Reaktion mit Retinal in einer energieabhängigen Reaktion „zur Purpurnembran auskristallisieren“. Diese Reaktion ist umkehrbar. Ablösen des Retinals durch Retinaloximbildung löst die Purpurnembranbereiche wieder auf. Rekonstitution des Bacteriorhodopsins durch Retinalzugabe führt zu erneuter Bildung der Purpurnembran.

1. Einleitung

Die Untersuchung biologischer Membransysteme hat in den letzten zehn Jahren zu einem weitgehend akzeptierten Modell der Membranstruktur geführt, das unter dem Namen Flüssig-Mosaik-Modell bekannt wurde^[1]. Im Prinzip beschreibt dieses Modell eine Membran als Lösung von orientier-

ten Proteinmolekülen in einer zweidimensionalen Lipidmatrix. Diese Vorstellung lässt eine weitgehend freie Diffusion nicht nur der Lipidmoleküle, sondern auch der Membranproteine in der Ebene der Membran erwarten.

Diesem Normalfall stehen Spezialfälle gegenüber, bei denen das Membranprotein einen zweidimensionalen Kristallverband bildet. Ein solcher Fall ist in der Zellmembran von Halobakterien verwirklicht. Dort bildet Bacteriorhodopsin, der Retinal-Protein-Komplex, ein kristallines Gitter, das in der intakten Zelle nachweisbar ist^[2, 3]. Diese kristallinen Berei-

[*] M. Sumper, H. Reitmeier und D. Oesterhelt
Institut für Biochemie der Universität
Röntgenring 11, 8700 Würzburg

che lassen sich durch Membranfragmentierung freisetzen und isolieren. Aufgrund ihrer intensiven Farbe werden diese Membranstücke als Purpurmembran bezeichnet^[4-6]. Im Gegensatz zu den Sehpigmenten (z. B. Rhodopsin), die als Lichtsensoren wirken, arbeitet Bacteriorhodopsin als Licht-Energie-Wandler^[7]. Die Lichtabsorption löst einen photochemischen Cyclus aus, an den der Transport eines Protons durch die Membran gekoppelt ist. Der resultierende elektrochemische Gradient des Protons wird zur ATP-Synthese in der Zelle benutzt (Zusammenfassung in^[8]).

Zusammensetzung und Struktur der Purpurmembran erwiesen sich als ungewöhnlich einfach. Mit der Kenntnis sowohl der Funktion als auch der Struktur bietet sich die Purpurmembran als Modell für das Studium der Biosynthese einer Membran und deren Steuerung an.

2. Regulationsphänomene bei der Purpurmembransynthese

2.1. Chemische Zusammensetzung der Purpurmembran

Isolierte Purpurmembran besteht zu ca. 75% aus pigmenthaltigem Protein und zu 25% aus Lipid, entsprechend zehn Lipidmolekülen auf ein Proteinmolekül. Als Protein liegt ausschließlich Bacteriorhodopsin vor, ein Proteinmolekül vom ungefähren MG 26000, das ein Retinalmolekül gebunden enthält^[2]. Retinal-freies Bacteriorhodopsin wird Bacterioopsin genannt. Mehr als 50% der Lipide werden von einem Dietheranalogen des Phosphatidylglycerophosphates gestellt, weitere 30% durch zwei Glykolipide (Abb. 1). Eine Besonderheit der Halobakterienlipide ist das Fehlen von Fettsäuren; an deren Stelle tritt die invariable Seitenkette des etherartig gebundenen Isoprenoidalkohols Dihydrophytol^[9].

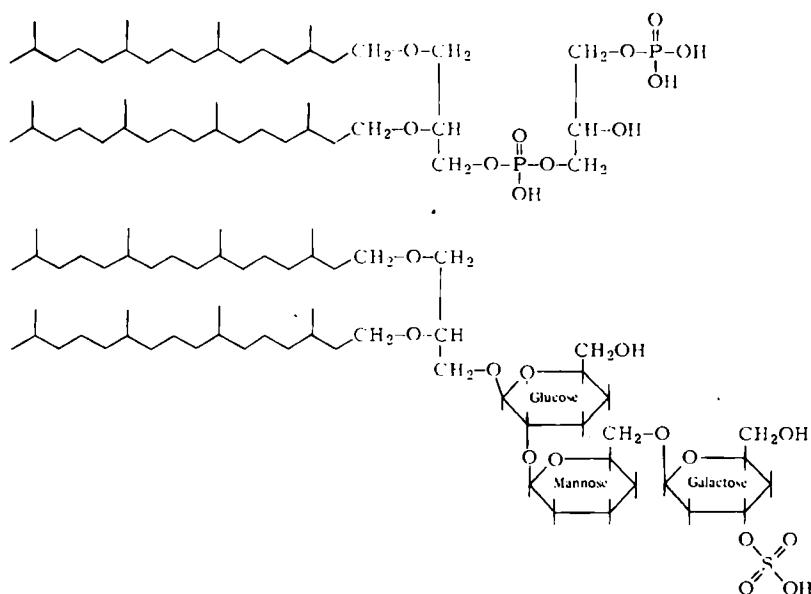


Abb. 1. Hauptkomponenten der Purpurmembranlipide. Oben: Dietheranaloges des Phosphatidylglycerophosphates (PGP); unten: Glykolipidsulfat. Neben den abgebildeten Strukturen kommen auch die unveresterten Lipide (ohne den endständigen Phosphat- oder Sulfatrest) vor.

2.2. Einfluß von Sauerstoff und Licht auf die Purpurmembransynthese

Halobakterien, deren Wachstum nicht durch mangelnde Sauerstoffzufuhr limitiert wird, synthetisieren keine Purpur-

membran^[20]. Sinkender Sauerstoffpartialdruck im Medium löst direkt oder indirekt die Synthese der Purpurmembran aus. Da also diese Membran nicht zur konstitutiven Ausrüstung der Bakterienzelle gehört, aber als Licht-Energie-Wandler zur ATP-Synthese herangezogen werden kann, erscheint die Funktion eines „Notstromaggregates“ der Zelle offensichtlich. Wenn die Geschwindigkeit der ATP-Synthese über die oxidative Phosphorylierung nicht mehr ausreicht, wird die Purpurmembran zusätzlich bereitgestellt. Im Gegensatz zu Sauerstoff übt Licht keinen vergleichbaren Einfluß auf die Purpurmembransynthese aus (vgl. Abschnitt 3.2).

Die Untersuchung dieser induzierbaren Membransynthese muß letztlich die zeitliche Steuerung der Synthese aller Membranbestandteile, also von Pigment (Retinal), Protein (Bacterioopsin) und Lipid aufklären und insbesondere die Frage der Koordination der drei Synthesewege beantworten.

3. Synthese der Bestandteile der Purpurmembran

3.1. Carotinoidsynthese in Halobakterien

Die Bildung von Bacteriorhodopsin und damit der Purpurmembran ist notwendigerweise von der Anwesenheit des Vitamin-A-Aldehyds (Retinal) abhängig. Retinal entsteht in Tieren durch oxidative Spaltung der zentralen Doppelbindung des β -Carotins. β -Carotin seinerseits wird in pflanzlichen Systemen aus Isopentenylpyrophosphat auf dem in Abbildung 2 skizzierten Weg aufgebaut und von Tieren als Provitamin A benötigt^[10-15]. Bei der de-novo-Retinalsynthese der Halobakterien laufen mit großer Wahrscheinlichkeit beide genannten Synthesen ab, wie zahlreiche neuere Untersuchungen zeigen. Einerseits konnten die in Abbildung 2 postulierten Zwischenstufen zum Teil direkt nachgewiesen werden, andererseits ge-

lang es vor kurzem, in einem in-vitro-System aus *H. cutirubrum* die Synthese von β -Carotin aus Isopentenylpyrophosphat nachzuweisen^[16, 17]. Als Besonderheit der Carotinoidsynthese in Halobakterien treten als Hauptprodukte C₅₀-Carotinoide auf, insbesondere die Bacterioruberine. Diese entstehen

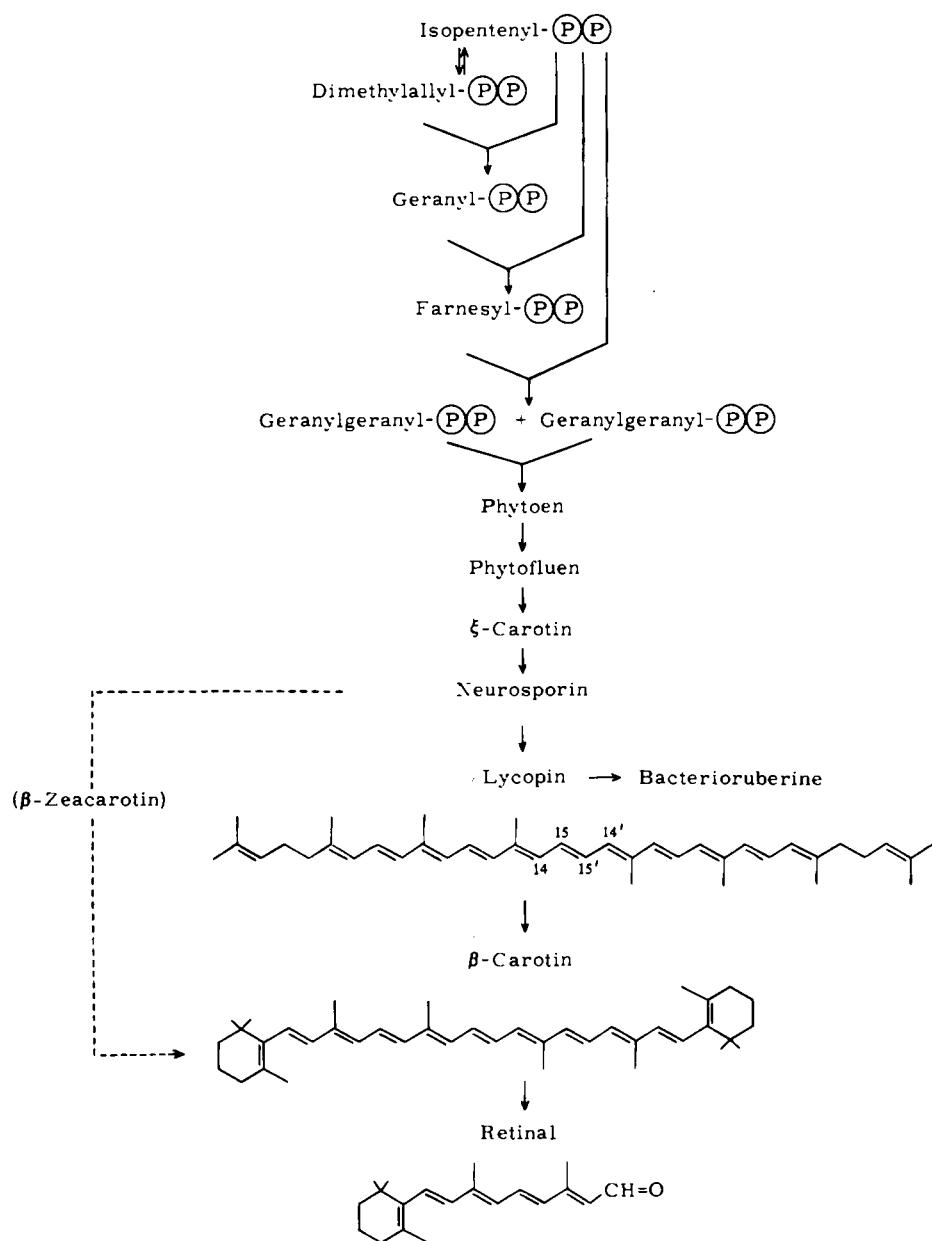


Abb. 2. Schematische Darstellung der Carotinoidbiosynthese. (P₂P) = Pyrophosphat.

durch Anknüpfen zweier C₅-Isoprenbausteine an die Enden eines C₄₀-Carotinoids^[18]. Ungeklärt ist die Frage, ob Lycopin ein gemeinsames Zwischenprodukt der β-Carotin- (Retinal-) und Bacterioruberinsynthese ist. Alternativ wäre der in Abbildung 2 formulierte Weg über β-Zeacarotin zum β-Carotin denkbar^[19].

3.2. Einfluß von Sauerstoff und Licht auf die Pigmentsynthese

Um eine möglichst störungsfreie Analyse der biosynthetischen Vorstufen des Retinals zu gewährleisten, wurden alle Untersuchungen mit einer Mutante von *H. halobium* durchgeführt, die keine Bacterioruberine synthetisiert (*H. halobium* R₁M₁). Abbildung 3 vergleicht die Spektren der Wildtyp-Bakterienzellen und der abgeleiteten Mutantenzellen R₁M₁. Während die Absorptionsbanden der Bacterioruberine bei Wildtypzellen diejenigen aller anderen Komponenten überdecken, lassen sich bei R₁M₁-Zellen die Absorptionsbanden von Bacteriorhodopsin, Cytochromen und Lycopin erkennen.

Die Bestimmung der Pigmente Lycopin, β-Carotin und Retinal erfolgte spektroskopisch nach Acetonextraktion von Zell-

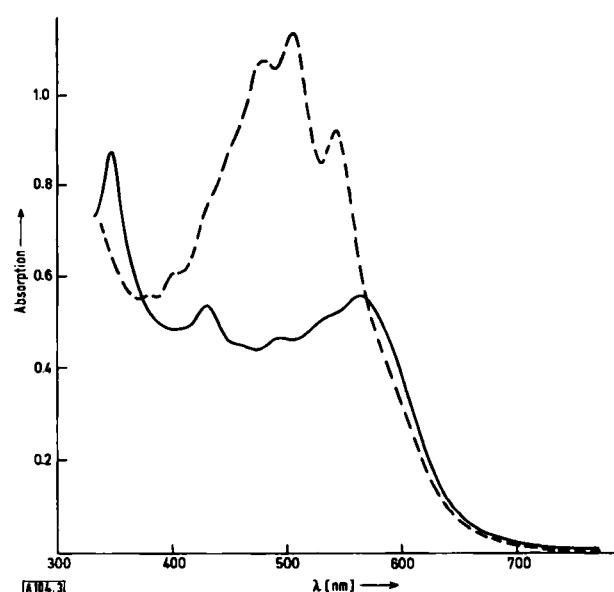


Abb. 3. Absorptionsspektren von Halobakterienzellen: Wildtypzellen (----) und Mutante R₁M₁ (—).

Lysaten. Das im Bacteriorhodopsin enthaltene Retinal wird unter diesen Bedingungen freigesetzt und kann deshalb mit der spezifischen Farbreaktion nach *Futterman* bestimmt werden^[21]. In Abbildung 4 sind die zeitlichen Konzentrationsänderungen der einzelnen Pigmente in einer wachsenden Halobakterienkultur dargestellt. Abbildung 4a zeigt die Pigmentmuster bei ausreichender Sauerstoffzufuhr und Abbildung 4b bei unzureichender Belüftung. Zellen mit ausreichender Sauerstoffzufuhr erreichen nur 10 bis 20 % des normalen Retinalgehalts. Das Auftreten von Retinal verläuft synchron mit dem Erscheinen der Purpumembran in den Zellen. Optimale Retinalsynthese führt zu geringen Lycopinkonzentrationen, umgekehrt hat eine niedrige Retinalkonzentration einen hohen Lycopinspiegel zur Folge.

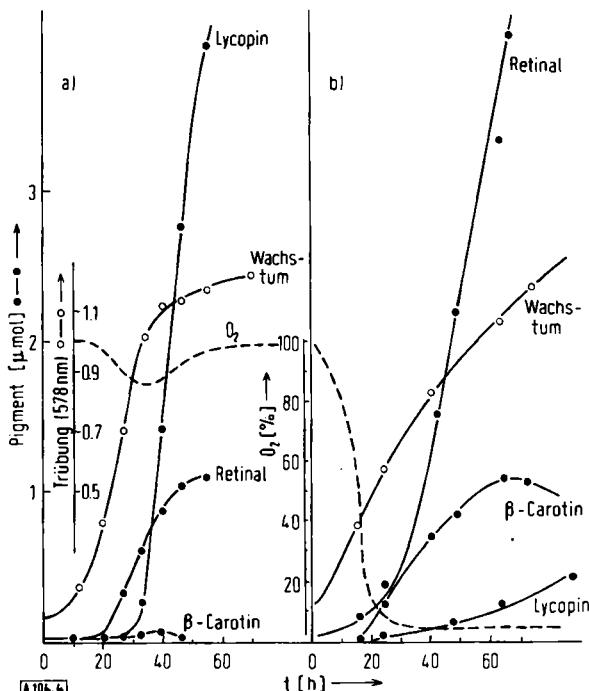


Abb. 4. Carotenoidsynthese in Halobakterien unter verschiedenen Wachstumsbedingungen; a) optimale Belüftung, b) das Wachstum limitierende Belüftung.

Die Zellen wurden in einem 14-Liter-Magnaferm (New Brunswick)-Fermenter mit Komplexmedium (250 g NaCl, 20 g MgSO₄ · 7 H₂O, 2 g KCl, 3 g Trinatriumcitrat · 2 H₂O und 10 g Oxoid Pepton L 37 pro Liter) unter Belichtung gezüchtet (20 × 8 Watt, Universal Weiß, Osram). Belüftung in a): 180 Liter/h, 500 Upm; Belüftung in b): 120 Liter/h, 300 Upm.

Proben (100 ml) wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen. Die Pigmente wurden aus den abzentrifugierten Zellen mit Aceton/H₂O (9:1) extrahiert und nach Überführen in Petrolether (K.p. = 50–70 °C) auf eine Aluminiumoxidsäule (20 g, Aktivitätsstufe II–III) aufgetragen. Elution von β-Carotin: 60 ml 20proz. Ether in Petrolether; Elution von Retinal: weitere 140 ml derselben Mischung; Elution von Lycopin: 40 ml Ether. β-Carotin und Lycopin wurden spektroskopisch in Hexanlösung bestimmt, Retinal nach [21]. Die Mengenangaben für die einzelnen Pigmente beziehen sich auf 10 Liter Kulturmedium.

Um den Einfluß von Licht zu prüfen, wurde das in Abbildung 4 dargestellte Experiment mit Dunkelkulturen wiederholt. Es ergab sich ein qualitativ gleiches Resultat, allerdings ist die β-Carotinkonzentration auf etwa das Fünffache erhöht. Möglicherweise wird β-Carotin bei der Belichtung zum Teil zerstört; auf ein Regulationsphänomen zwischen der β-Carotin- und der Retinalsynthesestufe darf deshalb nicht unbedingt geschlossen werden.

3.3. Bacteriorhodopsin- und Lipidsynthese

Eine interessante Frage betrifft den zeitlichen Verlauf der Bacteriorhodopsinsynthese (Bacteriorhodopsin ist das Protein der Pur-

purmembran). Es wäre denkbar, daß Bacteriorhodopsin zu den konstitutiven Proteinen der Zelle gehört, d. h. einen konstanten Anteil an der Proteinpopulation der Zelle zu jeder Wachstumsphase stellt. Abbildung 5 zeigt die Proteinmuster ganzer Zellen in vier aufeinanderfolgenden Wachstumsphasen und vergleicht sie mit dem zeitlichen Auftreten der Purpumembran. Während alle nachweisbaren Proteinspecies qualitativ unverän-

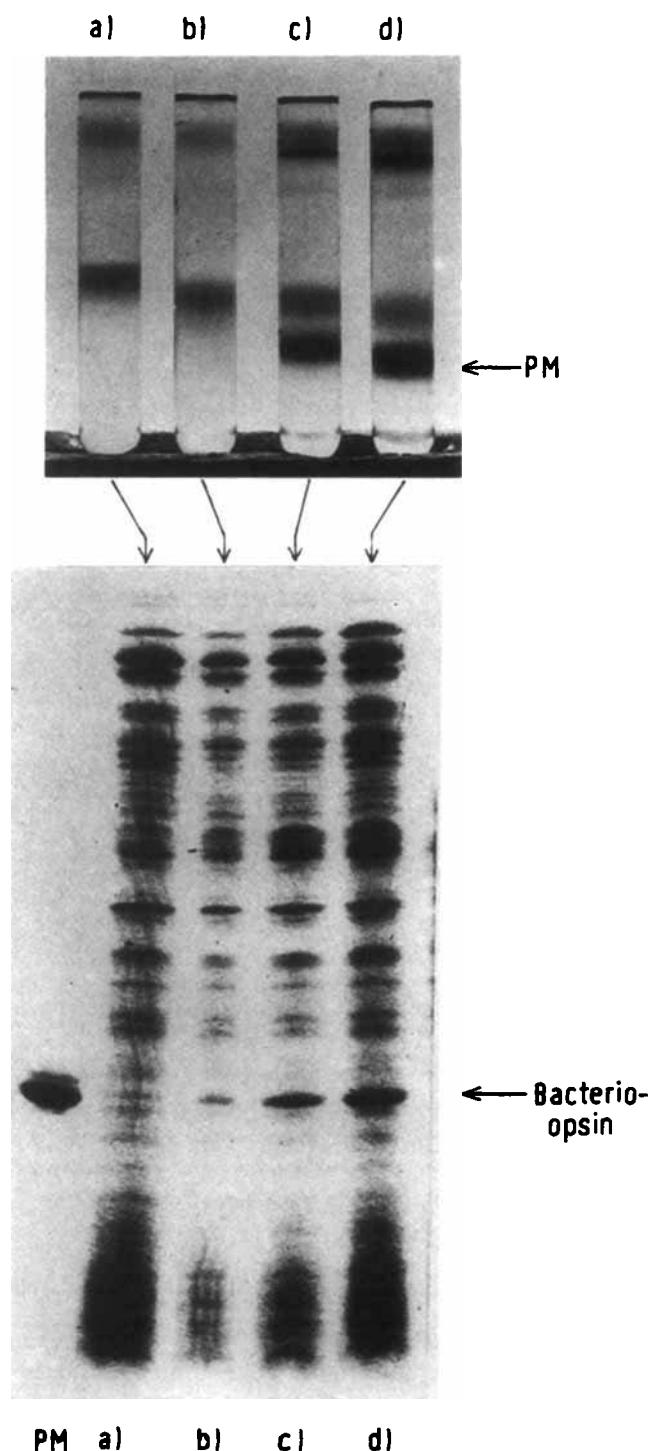


Abb. 5. Analyse des Purpumembran- (oben) und Bacteriorhodopsingehaltes (unten) von Halobakterienzellen in vier aufeinanderfolgenden Phasen der Wachstumskurve (bei limitierender Belüftung). a) Logarithmische Phase (47 h); b) späte logarithmische Phase (55 h); c) und d) frühe (72 h) bzw. späte (101 h) stationäre Phase.

Gleiche Zellmengen wurden mit Wasser lysiert, auf eine Saccharoselösung mit Dichtegradient (20–45 %) geschichtet und bei 200000 g über Nacht zentrifugiert. Aliquote der Lysate wurden auf Polyacrylamidgelen (Gradientengele: 10–25 %) in Gegenwart von 0.1 % Laurylsulfat elektrophoretisch aufgetrennt. Als Bacteriorhodopsin-Referenz wurde isolierte Purpumembran (PM) aufgetragen.

dert erscheinen, steigt der Bacterioopsinanteil synchron mit dem Auftreten der Purpurmembran auch noch in der stationären Wachstumsphase der Zelle deutlich an.

Durch ^{32}P - und ^{35}S -Pulsmarkierungsexperimente^[22] wurde die zeitliche Steuerung der Synthese der Purpurmembranlipide untersucht. Es zeigte sich, daß die Purpurmembranlipide schon lange vor dem Einsetzen (bereits in der logarithmischen Wachstumsphase der Bakterien) der Retinal- und Bacterioopsinsynthese aufgebaut werden, d.h. die zur Bildung der Purpurmembran benötigten Lipide werden dem Lipidreservoir der Zelle entnommen.

4. Membranfraktionen aus Halobakterien

4.1. Die Purpurmembran als differenzierter Membranbereich

Die isolierte Purpurmembran enthält Bacteriorhodopsinmoleküle in einer zweidimensionalen, hexagonal-kristallinen Anordnung^[3]. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen der intakten Zellen mit Hilfe der Gefrierbrechtechnik ließ sich dieselbe Anordnung des Bacteriorhodopsins in der Zellmembran nachweisen. Die Purpurmembran liegt nach diesen Untersuchungen also auch *in vivo* als differenzierter, inselförmiger Bereich der Zellmembran vor^[3]. Das Entstehen eines solchen differenzierten Bereiches ist ein interessantes Problem. Denkbar wäre ein direktes Kristallisieren des Bacteriorhodopsins unmittelbar nach seinem Einbau in die Zell-

membran. Es könnten aber auch biosynthetische Vorstufen der Purpurmembran als bereits differenzierte Bereiche der Zellmembran existieren. Zur Klärung dieser Fragen können Fragmentierungsversuche der Zellmembran und die Analyse der Fragmente dienen. Für die Untersuchung der Biosynthese der Purpurmembran sind diejenigen Membranfraktionen von Interesse, in denen Bacteriorhodopsin, Bacterioopsin oder eine der biosynthetischen Vorstufen des Retinals auftreten.

4.2. Fragmentierung der Zellmembran

Verringerung der Salzkonzentration im Medium führt zur Lyse der Halobakterien, d.h. das Cytoplasma der Zelle wird freigesetzt^[14]. Zur Auf trennung von Membranen dient üblicherweise eine isopyknische Zentrifugation (Dichtegradientenzentrifugation) in Saccharose. Wird der Membrananteil von Zell-Lysaten aus Halobakterien in Gegenwart von 0.5 M NaCl isopyknisch zentrifugiert, erhält man eine Hauptmembranfraktion, deren Absorptionsspektrum in Abbildung 6 dargestellt ist. Die Absorptionsbanden bei 340, 419 und 560 nm werden durch Lycopin, Cytochrom bzw. Bacteriorhodopsin verursacht. Zentrifugation desselben Lysates in Abwesenheit von NaCl läßt drei Membranfraktionen A, B, C mit verschiedenen Absorptionseigenschaften erscheinen. Fraktion A enthält das gesamte Lycopin, Fraktion B das gesamte Cytochrom und einen Teil des Bacteriorhodopsins, Fraktion C (Purpurmem-

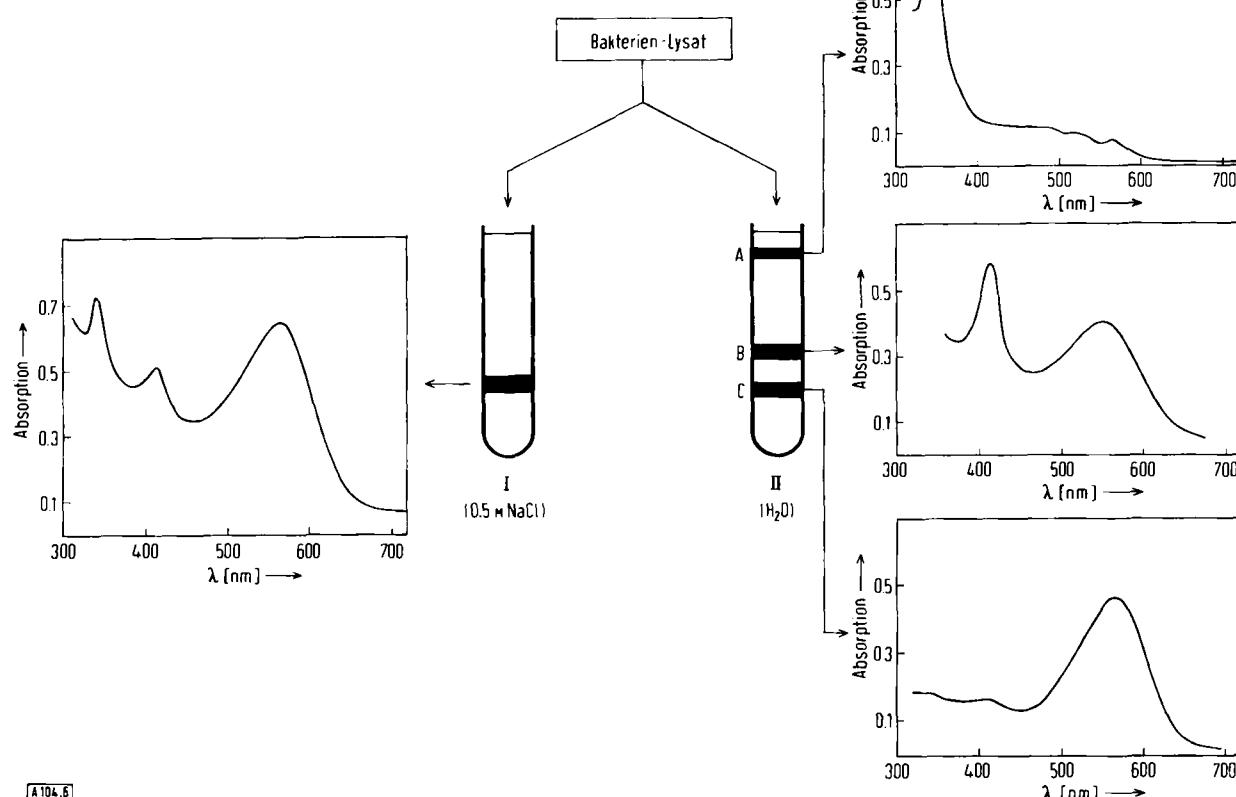


Abb. 6. Fragmentierung der Zellmembran bei niedriger Ionenstärke. Ein Zell-Lysat wurde auf eine Saccharoselösung mit Dichtegradient (20–45%) mit (I) und ohne (II) NaCl (0.5 M) geschichtet und bei 200000 g über Nacht zentrifugiert. Die Spektren der Fraktionen wurden mit einem Aminco DW2 registriert. A: Rote Membran; B: Braune Membran, C: Purpurmembran (siehe Text).

bran) nur Bacteriorhodopsin. Diese Aufspaltung läßt einen Aufbau der Zellmembran aus differenzierten Bereichen vermuten.

In Tabelle 1 sind einige Eigenschaften der Membranfraktionen A, B und C zusammengestellt. Wegen ihrer charakteristischen Farbe werden sie als Rote Membran (Membranfraktion RM 340), als Braune Membran und als Purpurnmembran bezeichnet.

und als Pyridinium-Komplex im Differenzspektrum (reduziert/oxidiert) charakteristische Absorptionen bei 418, 524 und 554 nm zeigt. Die Absorption bei 560 nm ist nach allen getesteten Kriterien (z. B. photochemisches Verhalten) dem Bacteriorhodopsin zuzuschreiben. Der Bacteriorhodopsingehalt der Braune Membran wird auch durch die elektrophoretische Analyse der Proteine dieser Membran bestätigt. Es treten zwei Hauptkomponenten auf, von denen die eine ebenso wie

Tabelle 1. Einige Eigenschaften der Membranfraktionen A, B und C (siehe Abb. 6).

Fraktion	Absorptionsmaxima [nm]	Schwebedichte [g/cm ³]	Proteingehalt [%]	Pigment
A: Rote Membran RM 340	340 (492, 523, 565)	ca. 1.06	< 5	Lycopin
B: Braune Membran	419, 560	ca. 1.14	?	Häm, Retinal
C: Purpurnmembran	560	1.18	ca. 75	Retinal

Die Membranfraktion RM 340 zeichnet sich durch mehrere ungewöhnliche Eigenschaften aus: Ihr Proteingehalt liegt unter 5 % des Trockengewichts; dies bedingt ihre niedrige Schwebedichte. Die Absorptionsmaxima lassen nicht ohne weiteres Lycopin als Pigment erkennen.

Die Zugabe organischer Lösungsmittel (z. B. Aceton) ändert das Absorptionsspektrum drastisch (Abb. 7); es entspricht nun dem des all-trans-Lycopins. Die Identität des Pigmentes der RM 340 mit Lycopin wurde zusätzlich durch Schmelzpunkt und Massenspektrum belegt. Die all-trans-Konfiguration ließ sich durch die jod-katalysierte Isomerisierung zu einem Gemisch von cis- und trans-Isomer zeigen^[23].

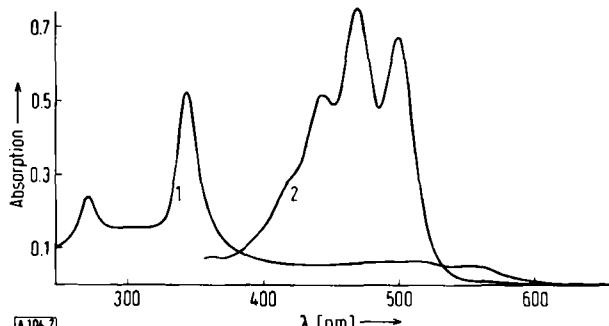


Abb. 7. Nachweis von Lycopin als Pigment der Roten Membran RM 340. 1: Absorptionsspektrum der RM 340 in Wasser, 2: in Aceton.

Das ungewöhnliche Absorptionsverhalten des Lycopins in der Membranfraktion RM 340 ist nicht leicht zu interpretieren. Die Existenz eines cis-Isomers, das bei Lösungsmittelextraktion in all-trans-Lycopin überginge, erscheint unwahrscheinlich: Isomere mit so hoher Absorption im „cis-Bereich“ und so geringer Absorption im Sichtbaren sind nicht bekannt^[23]. Plausibler ist es, eine Drehung des Lycopinmoleküles um seine 14—15- und 14'—15'-Einfachbindungen anzunehmen (vgl. Abb. 2). Ein solches s-cis-Konformer besitzt die Form eines Stabes, in dem die π-Elektronen der zentralen Doppelbindung senkrecht zum π-Elektronensystem des restlichen Moleküls stehen. Dadurch wird das konjugierte π-Elektronensystem mit seinen elf Doppelbindungen unterbrochen. Es entstehen zwei Systeme mit je fünf konjugierten Doppelbindungen, was die Absorption bei 340 nm und den hohen Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_M = 120000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) erklären würde.

Die Braune Membran zeigt zwei charakteristische Absorptionen. Die Absorption bei 419 nm muß einem Cytochrom-b-Typ zugeordnet werden, da die Hämgruppe extrahierbar ist

Bacterioopsin wandert, während die andere die Proteinkomponente des Hämchromophors sein dürfte.

5. In-vivo-Versuche zur Biosynthese der Purpurnmembran

Wie aus den bisher geschilderten Experimenten hervorgeht, besteht ein enger Zusammenhang zwischen Retinal- und Purpurnmembransynthese. Um mögliche Zwischenstufen der Membranbildung zu finden, bietet sich der Einsatz spezifischer Inhibitoren für die Synthesewege der einzelnen Membrankomponenten an, z. B. Proteinbiosynthese-, Carotinoidsynthese- oder Lipidsyntheseinhibitoren.

Tabelle 2. Einfluß des Nicotins auf den Carotinoidgehalt in Halobakterien. Halobakterien wurden mit oder ohne Nicotin im Medium gezogen. (Bis 1 mM Nicotin wird die Wachstumsgeschwindigkeit nicht beeinflußt.) Zur Analyse der Pigmente in der stationären Phase vgl. Legende zu Abb. 4.

Pigment	Nicotin [mM]			
	0	0.1	0.5	1.0
Lycopin	100 %		Steigerung 100 %—500 %	
β-Carotin	100 %	< 1 %	< 1 %	< 1 %
Retinal	100 %	8 %	2 %	< 1 %

Im folgenden werden die bisherigen experimentellen Ergebnisse mit Nicotin, einem Inhibitor der β-Carotinbildung, beschrieben. Wie Tabelle 2 zeigt, wird die β-Carotinbildung in Halobakterien zwischen 0.1 und 1 mM Nicotin im Medium gehemmt, gleichzeitig steigt der Lycopingehalt der Zellen („Nicotinzellen“) stark an. Dieses Ergebnis ist aufgrund der Tatsache zu erwarten, daß Nicotin die Cyclisierung des Lycopins zu β-Carotin inhibiert^[24]. Sollte die Bacterioopsinsynthese durch Retinal gesteuert werden, so muß Nicotin gleichzeitig mit der Retinalsynthese auch die Bacterioopsinsynthese blockieren. Dies ist jedoch nicht der Fall. Bacterioopsin wird in den Zellen auch bei Gegenwart von Nicotin (d. h. in Abwesenheit von Retinal) gebildet.

Damit entsteht die Frage nach der Lokalisation des Bacterioopsins in der Zellmembran dieser „Nicotinzellen“. Verhält sich Bacterioopsin wie Bacteriorhodopsin, so muß man anstelle der Purpurnmembran eine farblose Membranfraktion gleicher Dichte und Zusammensetzung erwarten. Der einfachste Nachweis des Bacterioopsins erfolgt durch Retinalzugabe, wobei Bacteriorhodopsin rekonstituiert wird^[26]. Mit dieser Methode

wurden die Membranfraktionen von Nicotinzellen nach isopyknischer Zentrifugation analysiert. Überraschenderweise befindet sich das gesamte Bacterioopsin in der Brauen Membran (Abb. 8).

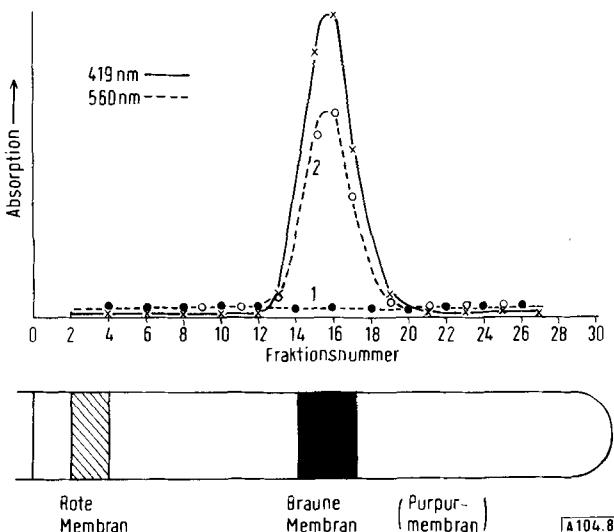


Abb. 8. Nachweis und Lokalisation des Bacterioopsins in „retinal-freien“ Zellen.

Die Zellen wurden in Gegenwart von 1 mM Nicotin unter limitierender Belüftung gezüchtet. Die Membranfraktionen wurden durch isopyknische Zentrifugation getrennt (vgl. Abb. 6). Die Absorption der Fraktionen wurde bei 419 sowie bei 560 nm vor (Kurve 1) und nach (Kurve 2) Retinalzugabe gemessen.

Offenbar ist die Braune Membran eine Vorstufe der Purpurmembran. Neugebildetes Bacterioopsin tritt zunächst in der Brauen Membran auf und kann demnach erst nach Reaktion mit Retinal zu Bacteriorhodopsin „zur Purpurmembran auskristallisieren“. Diese Arbeitshypothese veranschaulicht das Schema in Abbildung 9.

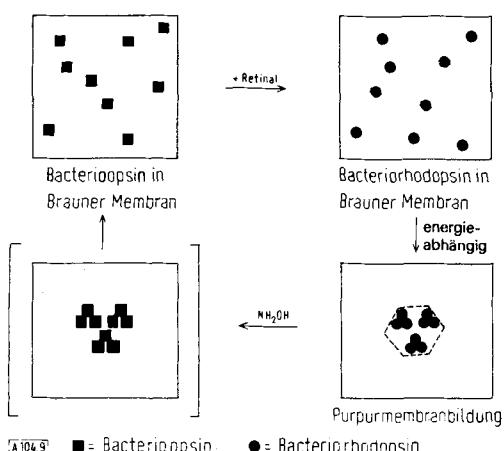


Abb. 9. Schematische Darstellung einer Arbeitshypothese über die Purpurmembranbildung.

Danach muß bei Zugabe von Retinal zu „Nicotinzellen“ Bacteriorhodopsin entstehen, vorausgesetzt, Retinal kann in die Zellmembran eindiffundieren. Daß dies möglich ist, belegt Abbildung 10. Bei diesem Experiment wurden „Nicotinzellen“ lediglich in gesättigter Salzlösung (Basalsalz), also ohne jegliche Energiequelle, suspendiert und mit Retinal versetzt. Nach Bildung des Bacteriorhodopsins sollte die Purpurmembran

entstehen. Abbildung 11a zeigt, daß dies nicht der Fall ist: Das gesamte gebildete Bacteriorhodopsin verbleibt in der Brauen Membran. Offensichtlich kristallisiert Bacteriorhodopsin nicht spontan zur Purpurmembran aus.

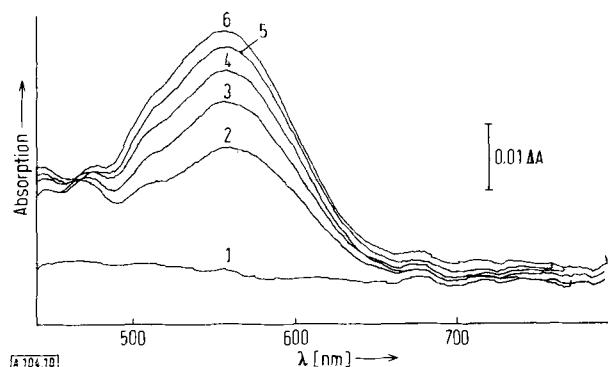


Abb. 10. Rekonstitution von Bacteriorhodopsin in „retinal-freien“ Zellen durch Zugabe von Retinal.

In Gegenwart von Nicotin (1 mM) gezogene Zellen wurden in Basalsalz (250 g NaCl, 2 g KCl, 20 g MgSO₄ · 7H₂O pro Liter) in Gegenwart von 1 mM Nicotin resuspendiert. Nach Versetzen der Zellsuspension mit Retinal wurde das Differenzspektrum (Aminco DW 2) zu verschiedenen Zeiten registriert: 1: Vor Retinalzugabe; 2-6: 11, 18, 31, 77 und 122 min nach Retinalzugabe.

Wiederholt man das Experiment der Abbildung 11a jedoch in Gegenwart einer Energiequelle, z. B. L-Alanin, so entsteht Purpurmembran (Abb. 11 b). Die Energieabhängigkeit der Purpurmembranbildung aus Brauner Membran wird auch durch die Beobachtung nahegelegt, daß anstelle von Alanin Licht als Energiequelle für diesen Prozeß dienen kann. Da Licht, das von Bacteriorhodopsin absorbiert wird, den ATP-Spiegel der Zellen ansteigen läßt, legt dies eine ATP-abhängige Modifizierung einer der Purpurmembrankomponenten nahe (denkbar ist z. B. eine Phosphorylierung des Bacteriorhodopsins).

Wie die vorangegangenen Experimente gezeigt haben, ist Bacterioopsin nicht imstande, die Gitterstruktur der Purpurmembran auszubilden. Diese Eigenschaft des Bacterioopsins sollte sich auch nachweisen lassen, wenn der isolierten Purpurmembran das Retinal durch chemische Reaktion mit Hydroxylamin entzogen wird (vgl. Abb. 9). Wie Röntgenbeugungs-Experimente belegen, verliert die durch NH₂OH gebleichte Purpurmembran ihre Gitterstruktur und gewinnt sie durch Retinalzugabe zurück^[25]. Isolierte Purpurmembranblätter erzwingen notwendigerweise die dichte Packung der Bacterioopsinmoleküle, so daß für die gebleichte Purpurmembran (Apomembran) keine Dichteänderungen zu erwarten sind; sie werden auch nicht gefunden. Im Gegensatz dazu sollte in intakten Zellen eine laterale Diffusion des Bacterioopsins in der Zellmembran möglich sein, die zur Auflösung der Purpurmembranbereiche führt (vgl. Abb. 9). Isopyknische Zentrifugation der Lysate NH₂OH-gebleichter Zellen und Analyse der Membranfraktionen bestätigen dies: das gesamte Bacterioopsin findet sich nun in der Brauen Membran.

6. Schlußbemerkung

Die geschilderten Untersuchungen sind nur ein Anfang, um die Synthese und Assoziation von Membranbausteinen und die Regulation dieser Vorgänge zu verstehen. Bereits jetzt zeigt sich aber die Brauchbarkeit des Halobakteriensystems für die experimentelle Bearbeitung dieser Fragen.

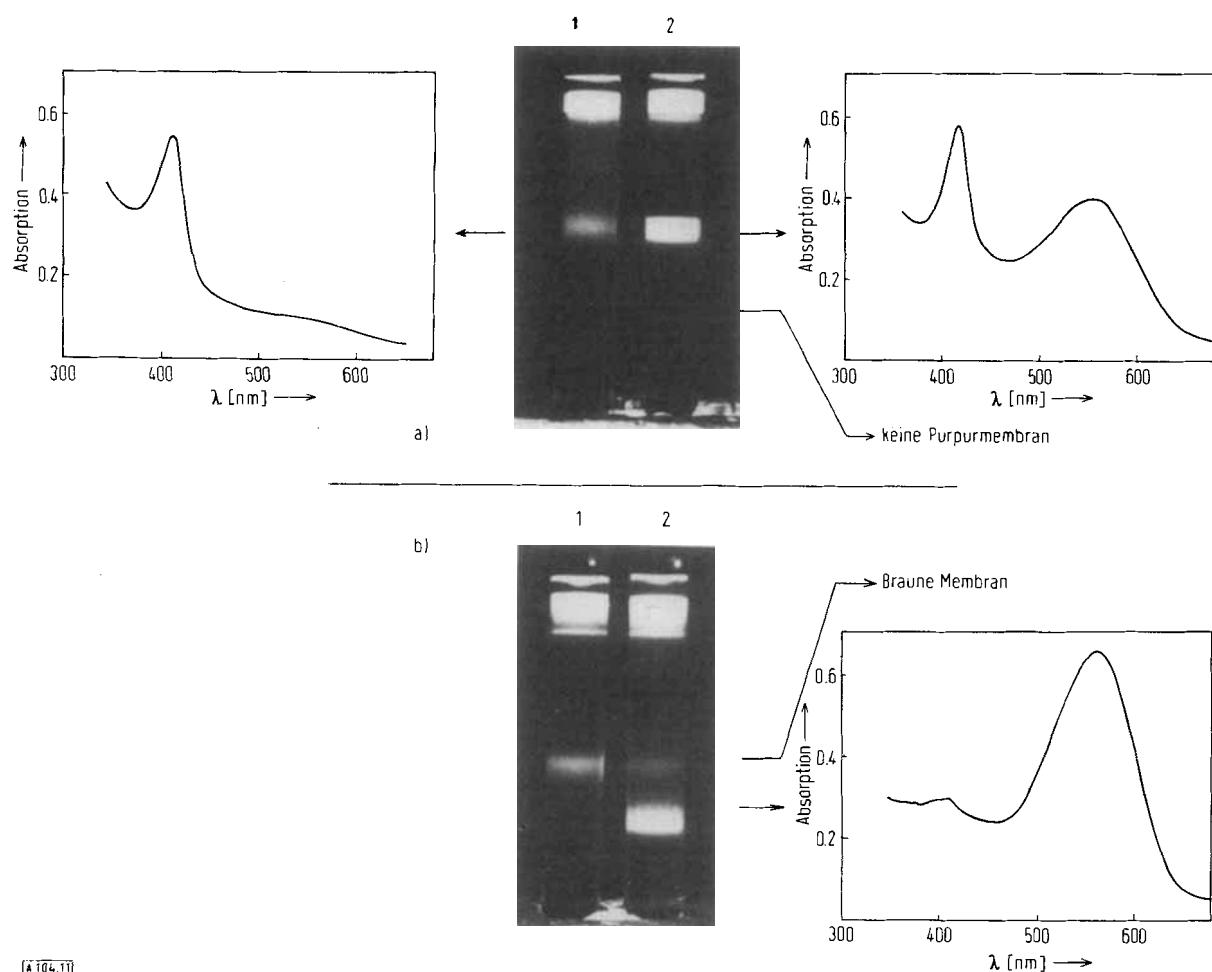


Abb. 11. „Auskristallisieren“ des Bacteriorhodopsins in der Braunalen Membran zur Purpumembran. a) „Retinal-freie“ Zellen wurden in Basalsalz (mit 1 mM Nicotin) suspendiert; eine Hälfte wurde mit Retinal versetzt und 8 h bei 40°C inkubiert. (Zur Analyse der Membranfraktionen siehe Abb. 6.) 1: ohne Retinal; 2: mit Retinal. b) wie a), jedoch unter Zugabe von 0,5% L-Alanin zum Inkubationsmedium. 1: ohne Retinal; 2: mit Retinal.

Frau G. Herrmann danken wir für zuverlässige Mitarbeit,
 Frau Ch. Sieber für die Geduld beim Abfassen des Manuskriptes.
 Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sind wir für Sachbeihilfen zu Dank verpflichtet.

Eingegangen am 10. Dezember 1975 [A 104]

- [1] S. J. Singer u. G. L. Nicolson, *Science* 175, 723 (1972).
- [2] D. Oesterhelt u. W. Stoeckenius, *Nature New Biol.* 233, 149 (1971).
- [3] A. E. Blaurock u. W. Stoeckenius, *Nature New Biol.* 233, 152 (1971).
- [4] W. Stoeckenius u. R. Rowen, *J. Cell Biol.* 34, 365 (1967).
- [5] W. Stoeckenius u. W. H. Kunau, *J. Cell Biol.* 38, 337 (1968).
- [6] D. Oesterhelt u. W. Stoeckenius, *Methods Enzymol.* 31, Part A, 667 (1974).
- [7] D. Oesterhelt in: *Biochemistry of Sensory Functions*. 25. Coll. Ges. Biol. Chemie, Mosbach. Springer, Berlin 1974, S. 55ff.
- [8] D. Oesterhelt, *Angew. Chem.* 88, 16 (1976); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 15, 17 (1976).
- [9] M. Kates, L. S. Yengoyan u. P. S. Sastry, *Biochim. Biophys. Acta* 98, 252 (1965).
- [10] F. Lynen, H. Eggerer, U. Henning u. I. Kessel, *Angew. Chem.* 70, 738 (1958).

- [11] S. Chaykin, J. Law, A. H. Phillips, T. T. Chen u. K. Bloch, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 44, 998 (1958).
- [12] H. H. Rees u. T. Goodwin in: *Biosynthesis*. Specialist Periodical Reports, Chem. Soc., London 1972, Bd. 1, S. 108ff.
- [13] J. W. Porter u. R. E. Lincoln, *Arch. Biochem.* 27, 390 (1950).
- [14] D. S. Goodman u. H. S. Huang, *Science* 149, 879 (1975).
- [15] J. A. Olson u. O. Hayaishi, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 54, 1364 (1965).
- [16] S. C. Kushwaha u. M. Kates, *Biochim. Biophys. Acta* 316, 235 (1973).
- [17] S. C. Kushwaha, M. Kates u. J. W. Porter, *Abstract of Contributed Papers IVth International Symposium on Carotenoids*, Bern 1975, S. 29.
- [18] M. Kelly, S. Norgård u. S. Liaaen-Jensen, *Acta Chem. Scand.* 24, 2169 (1970).
- [19] O. Isler: *Carotenoids*. Birkhäuser, Basel 1971, S. 577ff.
- [20] D. Oesterhelt u. W. Stoeckenius, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 2853 (1973).
- [21] S. Futterman u. S. D. Saslow, *J. Biol. Chem.* 236, 1652 (1961).
- [22] R. Wirsing, Diplomarbeit, Universität Würzburg 1976.
- [23] L. Zechmeister in H. M. Raven: *Biochemisches Taschenbuch*. 2. Aufl. Springer, Berlin 1964, S. 378ff.
- [24] C. D. Howes u. P. P. Batra, *Biochim. Biophys. Acta* 222, 174 (1970).
- [25] R. Henderson, persönliche Mitteilung.
- [26] D. Oesterhelt u. L. Schuhmann, *FEBS-Lett.* 44, 262 (1974).