

BBA 75 256

DIE MORPHOGENESE DES PHOTOSYNTHESAPPARATES VON *RHODOSPIRILLUM RUBRUM*

I. DIE ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON ZWEI MEMBRANSYSTEMEN

J. OELZE, M. BIEDERMANN UND G. DREWS

Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität, Freiburg i. Br. (Deutschland)

(Eingegangen am 30 September, 1968)

SUMMARY

Morphogenesis of the photosynthetic apparatus in Rhodospirillum rubrum. I. Isolation and characterization of two membrane systems

1. Two pigmented bands from cell-free extracts of light-grown *Rhodospirillum rubrum* could be isolated in a linear gradient of Ficoll by zone centrifugation.
 2. As shown by several methods, the lower band of the gradient contained chromatophores (thylakoids) in a highly purified form.
 3. In the upper band of the gradient, particles with an average diameter of 360 Å could be identified by electron microscopy.
 4. Electrophoresis of the contents of the upper band in agar gel (0.5 %) made it possible to separate two zones. Whereas only protein could be determined in the faster migrating zone, protein, pigments, lipids and activity of succinate dehydrogenase could be determined in the slower migrating zone.
 5. The chromatophores (thylakoids) of the lower band were split by treatment with phenol-formic acid-water (2:1:1, v/v/v) and then separated by gel electrophoresis in polyacrylamide into 5 main subunits.
 6. When the upper band of the gradient was treated with phenol-formic acid-water and separated by gel electrophoresis in polyacrylamide, only one of the 5 main subunits was obtained. This was characteristic of cytoplasmic membrane.
 7. The upper band of the gradient could be isolated from cultures grown under anaerobic light conditions, from cultures grown aerobically in the dark and from the carotenoid-free mutant strain of *R. rubrum* M 46, which forms only few chromatophores.
 8. The results indicate that the upper band of the Ficoll gradient consists mainly of mechanically disrupted cytoplasmic membrane.
 9. Morphogenetic relationships between cytoplasmic membrane and chromatophores are discussed.
-

EINLEITUNG

Die phototrophen Bakterien bilden unter den Bedingungen eines Photosynthese-Stoffwechsels, aber auch in Dunkelkulturen bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck

Membranstrukturen aus¹, an die das System der Photophosphorylierung und eine Reihe enzymatischer Prozesse gebunden sind^{2,3}. Die beim Aufbrechen der Zellen frei werdenden, in sich geschlossenen Doppelmembranen wurden von ihren Entdeckern Chromatophoren genannt⁴ und später in Anlehnung an MENKE⁵ als Thylakoide bezeichnet⁶.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Schnitten durch zahlreiche Vertreter der Rhodobacteriineae zeigen, dass die Thylakoide mit der cytoplasmatischen Membran verbunden sind. Aus elektronenmikroskopischen Beobachtungen wurde abgeleitet, dass die Thylakoide durch Einfaltung aus der cytoplasmatischen Membran gebildet werden^{1,7-9}. Es wäre aber auch denkbar, dass die Thylakoide unabhängig von der cytoplasmatischen Membran, jedoch in ihr verankert, entstehen. Beide Vorstellungen stehen mit den elektronenmikroskopischen Beobachtungen im Einklang. Es lässt sich aber nach den cytologischen Befunden nicht entscheiden, ob und in welchem Umfang die cytoplasmatische Membran am Aufbau der Thylakoide beteiligt ist. Nach gelelektrophoretischen Untersuchungen haben beide Membransysteme eine unterschiedliche makromolekulare Organisation^{1c}. Um Aussagen über Biosynthese und Morphogenese der cytoplasmatischen Membran und der Thylakoide machen zu können, ist es nötig, beide Membranen zu isolieren. Die Abtrennung der cytoplasmatischen Membran von der Zellwand bereitet aber, besonders bei gramnegativen Bakterien, erhebliche Schwierigkeiten¹¹. Es sei denn, man arbeitet mit stabilen L-Formen von *Proteus mirabilis* oder Vertretern der Mycoplasmatales (PPLO).

In der vorliegenden Mitteilung soll eine neue Methode beschrieben werden, die es gestattet, aus *Rhodospirillum rubrum* reine Thylakoide zu gewinnen. Mit Hilfe dieser Methode ist es auch möglich, eine zweite Fraktion zu isolieren, die Material der cytoplasmatischen Membran enthält. Die Untersuchungen über die Natur der beiden Fraktionen sollen erste Anhaltspunkte über mögliche Zusammenhänge zwischen der cytoplasmatischen Membran und den Thylakoiden erbringen.

MATERIAL UND METHODEN

Als Material für die Untersuchungen diente Stamm FR 1 von *R. rubrum*. Die aerobe Dunkelkultur in 500 ml Rundstehkolben erfolgte in 100 ml Nährösung R8ÄH (Lit. 12) auf einer Rundschrüttelmachine. Zur Anzucht von anaeroben Lichtkulturen wurden 50 ml Schraubdeckelflaschen mit aeroben Dunkelkulturen aus der späten log-Phase (20 Std) beimpft, luftblasenfrei mit Nährösung gefüllt und in einer temperierbaren Truhe bei 4000 Lux bebrütet¹³. Alle Kulturen wurden 20-24 Std bei 30° angezogen. Die semiaerobe Kultur der Mutante M 46 geschah in Rührkolben in hoher Schicht¹⁴.

Fraktionierung der Zellen. 24 Std alte, anaerobe Lichtkulturen wurden abzentrifugiert und mit 0.02 M Tris-Puffer (pH 7.8) gewaschen. Dieser Puffer wurde für alle Versuche verwandt, weitere Zusätze werden im Text beschrieben. Die ausgewaschenen Zellen wurden in 10 ml Tris-Puffer suspendiert und zweimal in der gekühlten French pressure cell behandelt. Das Homogenat wurde durch eine 20 minütige Zentrifugation bei 15 900 × g von groben Zelltrümmern und ganzen Zellen gereinigt. Das erhaltene Sediment SI wurde verworfen. Der Überstand UI wurde je nach Bedingungen (siehe ERGEBNISSE) 60 Min zwischen 54 491 × g und 313 934 × g in der Spinco L 2-65 (Beckman) abzentrifugiert. Das dabei entstandene Sediment SII wird im folgenden

Text als "Rohthylakoid"-Fraktion bezeichnet. Der Überstand ÜII wurde in den meisten Fällen verworfen. Die Rohthylakoid-Fraktion wurde in wenig Tris-Puffer aufgenommen und in Portionen zu 0.3 ml auf einen linearen Gradienten aufgetragen, dessen Dichte zwischen 1.06 und 1.02 lag. Für die Herstellung des Gradienten wurden je 2.5 ml Ficoll-Lösungen (Ficoll, Pharmacia, Frankfurt) der oben genannten Dichten in Tris-Puffer verwendet. Nach der Zonenzentrifugation für die Dauer von 120 Min bei $82\,860 \times g$ oder $159\,203 \times g$ (Rotor SW 65 der Spinco L2-65), wurde eine U-förmig gebogene Kapillare mit ihrem kürzeren Schenkel, der am Ende wenig nach oben gekrümmmt war, bis auf den Boden des Gradienten-Röhrchens geführt, während der längere Schenkel in die Tropfdüse eines LKB-Ultron-Rac-Fraktionssammlers ragte. Der Gradient wurde auf diese Weise von seiner stärksten Konzentration her in 28–30 Fraktionen zu je 3 Tropfen zerlegt. Nach dem Verdünnen mit 2.5–3.0 ml Tris-Puffer, wurde die Absorption der Fraktionen bei 880 nm (Bacteriochlorophyll-*in vivo* Absorptionsmaximum bei *R. rubrum*) und 260 nm (Nucleinsäuren) ermittelt und gegen die Fraktionsnummern zu einem Gradienten-Diagramm aufgetragen. Das stets im Gradienten-Röhrchen auftretende Sediment wurde verworfen.

Elektronenmikroskopie. Die ausgewaschenen Fraktionen wurden in Tris-Puffer aufgenommen und auf entfettete, mit einem Kohlefilm beschichtete elektronenmikroskopische Objektträger gegeben. Die Tropfen wurden mit Filterpapier abgezogen. Nach Negativ-Kontrastierung mit 2 %iger Phosphorwolframsäure (mit KOH auf pH 7.2 eingestellt) erfolgte die Betrachtung der Präparate im Elektronenmikroskop Elmiskop I A (Siemens).

Analytische Ultrazentrifugation. Die in Tris-Puffer aufgenommenen Fraktionen wurden bei 10589 Umdrehungen/Min in der analytischen Ultrazentrifuge (Beckman) bei $+25^\circ$ sedimentiert.

Elektrophoretische Untersuchungen. Die Auftrennung der Fraktionen durch disc-Elektrophorese wurde nach DAVIS¹⁵ in 5.6 % Polyacrylamid durchgeführt. Bei einer Klemmenspannung von 200 V wurden Fraktionen elektrophoretisch einer Trennung in 0.5 % Ionagar No. 2 (Oxoid, London) unterworfen. Die Laufzeit betrug 79 Min. Die Aufspaltung der Partikel in ihre Proteinuntereinheiten unter der Einwirkung von Phenol-Ameisensäure und die elektrophoretische Trennung dieser Proteine erfolgte nach einer modifizierten Methode¹⁰ von BRAUNITZER UND BAUER¹⁶. Die elektrophoretisch aufgetrennten und mit Amidoschwarz angefärbten Zonen wurden mit einem Densitometer vermessen. Proteine wurden mit Amidoschwarz (Serva) und lipidhaltige Zonen mit Sudanschwarz B (Merck) angefärbt. Der Nachweis von Succinat-Dehydrogenase geschah nach HESS UND DIETRICH¹⁷.

ERGEBNISSE

Die Auftrennung der Rohthylakoidfraktion im Ficoll-Gradienten Variation der Zentrifugations-Geschwindigkeiten

Wie bereits im methodischen Teil beschrieben, wurde die Rohthylakoid-Fraktion durch 60 Min Zentrifugation zwischen $54491 \times g$ und $313934 \times g$ aus einem Zellhomogenat gewonnen, das 20 Min bei $15900 \times g$ vorgereinigt worden war. Die Fig. 1 zeigt das Gradienten-Diagramm einer Rohthylakoid-Fraktion, die bei $176\,592 \times g$ (60 Min) sedimentiert und im Ficoll-Gradienten bei $82\,860 \times g$ (120 Min) aufgetrennt wurde. Eine bacteriochlorophyll-haltige Bande hat sich hierbei von einer

bei 260 nm absorbierenden Bande abgesetzt. Durch Erniedrigung der Vorzentrifugations-Geschwindigkeit auf $54490 \times g$ (60 Min) liess sich die Menge des bei 260 nm absorbierenden Materials erheblich verringern (Fig. 2). Durch diesen Schritt konnte auch die Verunreinigung der bacteriochlorophyll-tragenden Bande vermindert werden.

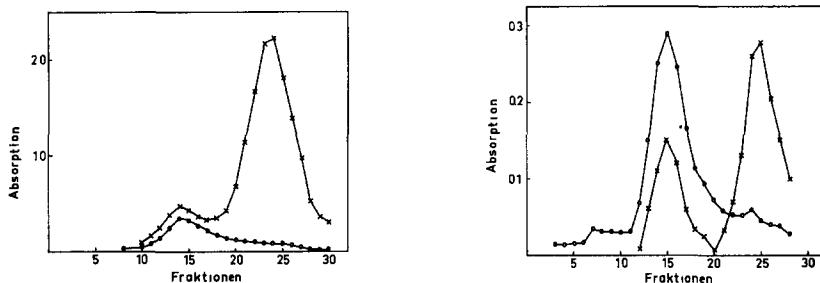


Fig. 1. Diagramm einer im Ficoll-Gradienten aufgetrennten Rohthylakoidfraktion (Aufarbeitung vergl. ERGEBNISSE) ○—○, $A_{4880 \text{ nm}}$; ×—×, $= A_{260 \text{ nm}}$

Fig. 2 Gradientendiagramm einer Rohthylakoidfraktion, die 60 Min bei $54490 \times g$ gewonnen wurde (Zeichenerklärung vergl. Fig. 1).

Beide oben genannten Zentrifugations-Geschwindigkeiten gestatten es jedoch nicht, das gesamte pigmentierte Material aus dem Überstand UII zu sedimentieren und damit in die Rohthylakoid-Fraktion aufzunehmen. Es gelingt dagegen, durch Erhöhung der Zentrifugations-Geschwindigkeit auf $313934 \times g$ (60 Min), alle bacteriochlorophyll-haltigen Komponenten aus dem Überstand UII weitgehend zu entfernen. Im Anschluss an die Gradienten-Zentrifugation dieser hochtourig gewonnenen Rohthylakoide lassen sich mit blossem Auge neben dem stets vorhandenen Sediment zwei pigmentierte Banden im Gradienten feststellen. Die untere, schwerere Bande tritt bereits nach der niedertourigen Vorzentrifugation auf (Fig. 1 und 2). Werden die Rohthylakoide bei $313934 \times g$ (60 Min) gewonnen, so erscheint im Gradienten dicht

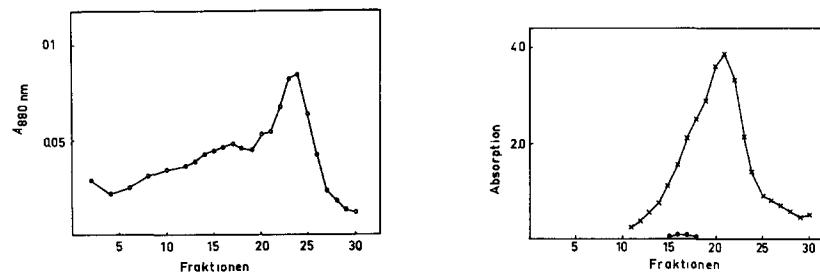


Fig. 3. Gradienten-Diagramm einer Rohthylakoidfraktion aus der Mutante M 46 von *R. rubrum* nach 72 Std Kulturdauer unter semiaeroben Bedingungen. Die Rohthylakoide wurden aus dem Überstand UI (vergl. METHODEN) 60 Min bei $313934 \times g$ abzentrifugiert und 120 Min im Ficoll-Gradienten bei $159203 \times g$ getrennt.

Fig. 4. Diagramm einer im Ficoll-Gradienten unter Zusatz von $0.01 \text{ M} \text{ MgCl}_2$ aufgetrennten Rohthylakoidfraktion. Die Rohthylakoide wurden aus dem Überstand UI (vergl. METHODEN) nach 60 Min bei $176592 \times g$ sedimentiert und 120 Min bei $82860 \times g$ im Gradienten getrennt (Zeichenerklärung vergl. Fig. 1).

oberhalb der schweren Bande eine zweite pigmentierte Bande. Diese leichte Bande liegt im Bereich des bei 260 nm absorbierenden Materials. Sie tritt auch auf, wenn Material aus pigmentfreien, aeroben Kulturen oder von der thylakoidarmen, carotinoidlosen Mutante M 46 (Lit. 18) aufgearbeitet wird. Die Bande ist dann schwach gelb bzw. grün-blau gefärbt. In Fig. 3 ist das Absorptionsdiagramm nach Auf trennung einer aus der Mutante M 46 gewonnenen Rohthylakoidfraktion im Gradienten aufgetragen. Der Gipfel der Absorption bei 880 nm im Bereich der Fraktionen 15–19 entspricht der schweren Bande.

Eine geringfügige Trennung der leichten Bande von der bei 260 nm absorbierenden Bande lässt sich durch Erhöhung der Sedimentationsgeschwindigkeit auf $159203 \times g$ (120 Min) erreichen.

Der Einfluss von Mg²⁺-Ionen auf die Bandenausbildung

Vielfach werden zur Thylakoid-Isolation Puffer verwandt, die Mg²⁺ enthalten. Nach GIBSON¹⁹ aggregieren Thylakoide von *Rhodopseudomonas sphaeroides* sehr stark bereits in Gegenwart von 0.01 M MgCl₂. WALLACH, KAMAT UND GAIL²⁰ stellten fest, dass auch Membranen aus Ascites-Tumor-Zellen bei Anwesenheit von Mg²⁺ aggregieren. Wie Fig. 4 zeigt, verhindert Mg²⁺ (0.01 M) im Tris-Puffer während der Aufarbeitung die Ausbildung von pigmentierten Banden im Ficoll-Gradienten. Das gesamte pigmentierte Material befand sich nach der Gradienten-Zentrifugation im Sediment. Mg²⁺ ist auch für die Adsorption von Ribosomen an Membranen²¹ und bei *in vitro* Systemen für die Bildung der 70-S Ribosomen aus ihren Untereinheiten erforderlich²². Demnach sollte es möglich sein, durch Entfernen von Mg²⁺ aus dem Bakterienhomogenat, die Rohthylakoid-Fraktion weitgehend von Ribosomen zu befreien. Aus diesem Grund wurde dem Tris-Puffer 0.1 % EDTA zugesetzt. Zur Demonstration des durch EDTA hervorgerufenen Effekts auf die Menge des bei 260 nm absorbierenden Materials im Ficoll-Gradienten wurde eine Hälfte einer aeroben Dunkelkultur allein in Tris-Puffer, die zweite Hälfte in Tris-Puffer mit 0.1 % EDTA aufgearbeitet. Das Gradienten-Diagramm (Fig. 5) zeigt, dass die bei 260 nm absorbierende Bande in Gegenwart von EDTA erheblich verringert ist. Die Lage und die Intensität der rot pigmentierten Banden aus der Rohthylakoid-Fraktion waren dagegen nach der Gradienten-Zentrifugation mit EDTA unverändert.

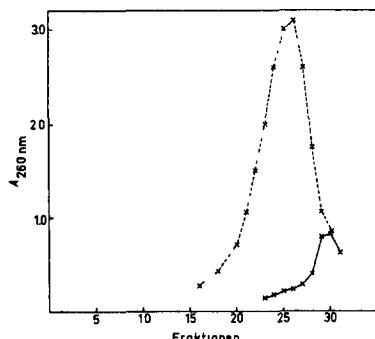


Fig. 5. Der Einfluss von EDTA (0.1 %) auf die Bandenstärke im Ficoll-Gradienten. Aus einer aeroben Dunkelkultur von *R. rubrum* wurde eine Rohfraktion unter Zusatz von EDTA (x—x) und ohne EDTA (x···x) gewonnen (Aufarbeitung vergl. Fig. 3).

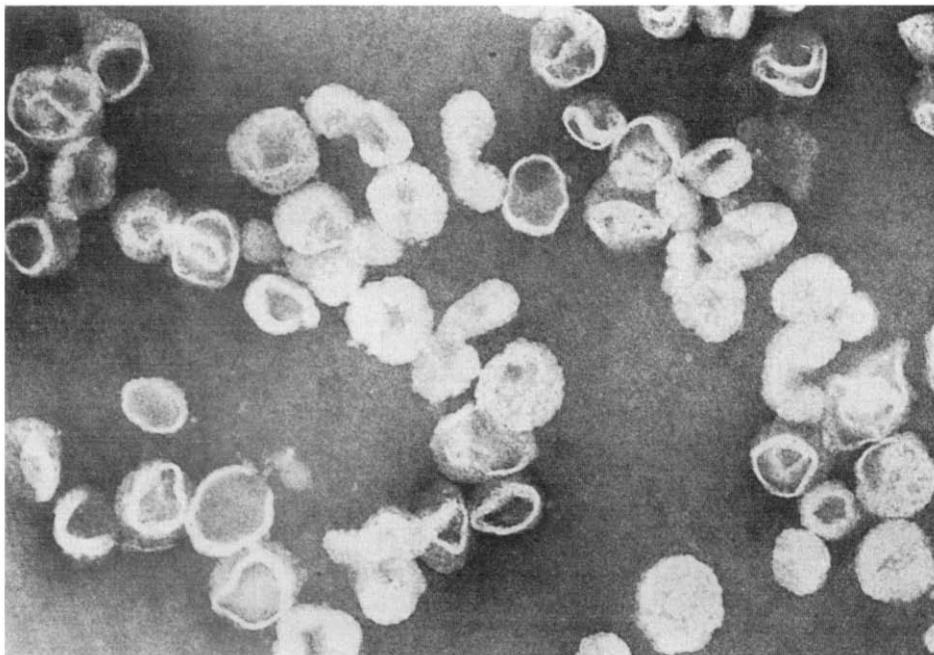


Fig. 6 Die Partikeln der schweren Bande des Ficoll-Gradienten. Die Rohthylakoidfraktion aus anaeroben Lichtkulturen von *R. rubrum* wurde zur Isolierung der schweren Bande aus dem Überstand UI (vergl. METHODEN) durch Zentrifugation bei $54\,491 \times g$ (60 Min) gewonnen. Die Trennung der Fraktion im Ficoll-Gradienten erfolgte bei $159\,203 \times g$ (120 Min). Die schwere Bande wurde dem Gradienten anschliessend entnommen, ausgewaschen, ein zweites Mal im Gradienten gereinigt und nach viermaligem Waschen für die Elektronenmikroskopie präpariert (vergl. METHODEN). Alle Aufarbeitungsschritte erfolgten in Tris-Puffer mit Zusatz von 0.1% EDTA ($\times 140\,000$).

Die Charakterisierung der pigmentierten Banden aus dem Ficoll-Gradienten

Die schwere Bande

Für die folgenden Untersuchungen wurde die Rohthylakoidfraktion nach 60 Min bei $54\,491 \times g$ gewonnen. Die Gradientenzentrifugation erfolgte bei $159\,203 \times g$ (120 Min). Die schwere Bande wurde dem Gradienten entnommen, ausgewaschen und ein zweites Mal im Gradienten gereinigt. Danach wurden die Partikeln der schweren Bande 3-4 mal ausgewaschen. Sämtliche Isolationsschritte wurden in Tris-Puffer plus 0.1% EDTA durchgeführt.

Elektronenmikroskopische Untersuchung. Das elektronenmikroskopische Bild der schweren roten Bande zeigt runde Partikeln (Fig. 6), deren mittlerer Durchmesser 730 Å beträgt. Vielfach ist die bei der Aufrocknung vesikulärer Gebilde sich ausbildende Randzone deutlich zu sehen. Die rote Bande besteht nur aus den charakteristischen bläschenförmigen Thylakoiden von *R. rubrum*. Verunreinigungen durch andere Membran- oder Zellwandbruchstücke waren nicht zu sehen.

Analytische Ultrazentrifugation. Das Schlierendiagramm der sedimentierenden Partikeln aus der schweren Bande wurde nach verschiedenen Zeiten aufgenommen. Fig. 7 (Aufnahme nach 29 Min bei 10589 Umdrehungen/Min) zeigt einen scharfen, symmetrischen Gipfel, der für die Einheitlichkeit des Materials spricht.

Disc-Elektrophorese. Material von UII (60 Min, $313934 \times g$) und von der schweren Bande wurden getrennt auf die Polyacrylamid-Säulen zur Elektrophorese aufgelagert. Nach 70 Min Laufzeit wurden beide Säulen fixiert und mit Amidoschwarz angefärbt. Der Vergleich der gewanderten Zonen zeigt, dass die Proteine des UII (Fig. 8c) nicht mehr in der gereinigten Thylakoidfraktion (schwere Bande, Fig. 8a) vorhanden sind. Die Thylakoidfraktion selbst ist nicht gewandert, sondern am Start geblieben.

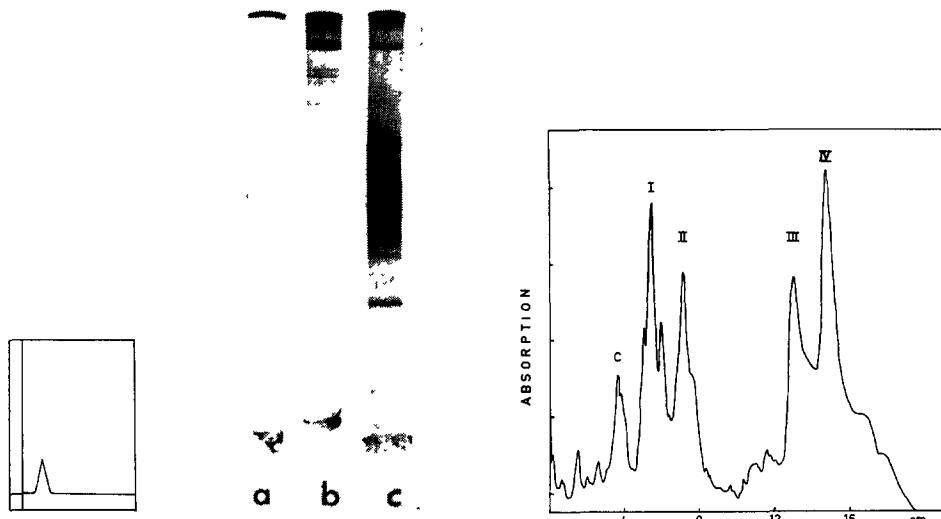


Fig. 7 Schlieren-Diagramm der schweren Bande bei 10589 Umdrehungen/Min. Aufnahme nach 29 Min (Präparation vergl. Fig. 6)

Fig. 8. Proteinhaltige Komponenten aus verschiedenen Fraktionen von *R. rubrum*. Disc-Elektrophorese vergl. *METHODEN* a, Schwere Bande (Präparation vergl. Fig. 6), b, Leichte pigmentierte Bande Aus anaeroben Lichtkulturen wurde die leichte Bande unter den bei Fig. 3 beschriebenen Zentrifugationsbedingungen isoliert, ausgewaschen und elektrophoretisch getrennt. EDTA-haltiger (0.1%) Tris-Puffer wurde für alle Aufarbeitungsschritte verwandt; c, Überstand UII nach $313934 \times g$ (60 Min).

Fig. 9 Pherogramm der in Phenol-Ameisensäure-Wasser zerlegten schweren Bande des Ficoll-Gradienten (Präparation vergl. *METHODEN* und Fig. 6, Zeichen im Text erklärt). Absorption bei 644 nm.

Gel-Elektrophorese unter Einwirkung von Phenol-Ameisensäure. Die Partikeln der schweren Bande wurden in Phenol-Wasser-Ameisensäure vollständig gelöst und dann durch Elektrophorese aufgetrennt. Das in Fig. 9 wiedergegebene Diagramm der densitometrisch vermessenen Pherogramme ergibt die gleichen Hauptmaxima wie sie von BIEDERMANN UND DREWS¹⁰ bei *R. rubrum* als thylakoidspezifisch beschrieben wurden (Zonen I bis IV). In der zitierten Arbeit wurde die Zone C der cytoplasmatischen Membran zugeordnet. Eine nach BIEDERMANN UND DREWS¹⁰ für die Zellwand-Rohfraktion typische Zone konnte nicht gefunden werden.

Die leichte Bande

Die folgenden Untersuchungen wurden an der leichten pigmentierten Bande aus anaeroben Lichtkulturen von *R. rubrum* durchgeführt. Diese Bande wurde aus der bei

$313\,934 \times g$ (60 Min) sedimentierten Rohthylakoidfraktion im Gradienten nach 120 Min bei $159\,203 \times g$ isoliert, ausgewaschen und ein weiteres Mal im Gradienten zentrifugiert. Anschliessend wurde sie 3–4 mal ausgewaschen. Auch in diesem Fall enthielt das Puffersystem grundsätzlich 0.1 % EDTA.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen. Das elektronenmikroskopische Bild (Fig. 10) zeigt vorwiegend runde Partikeln mit einem mittleren Durchmesser von 360 Å. Partikeln entsprechender Grösse konnten auch in der leichten Bande aus aeroben Dunkelkulturen beobachtet werden. Daneben treten auch längliche Gebilde auf.

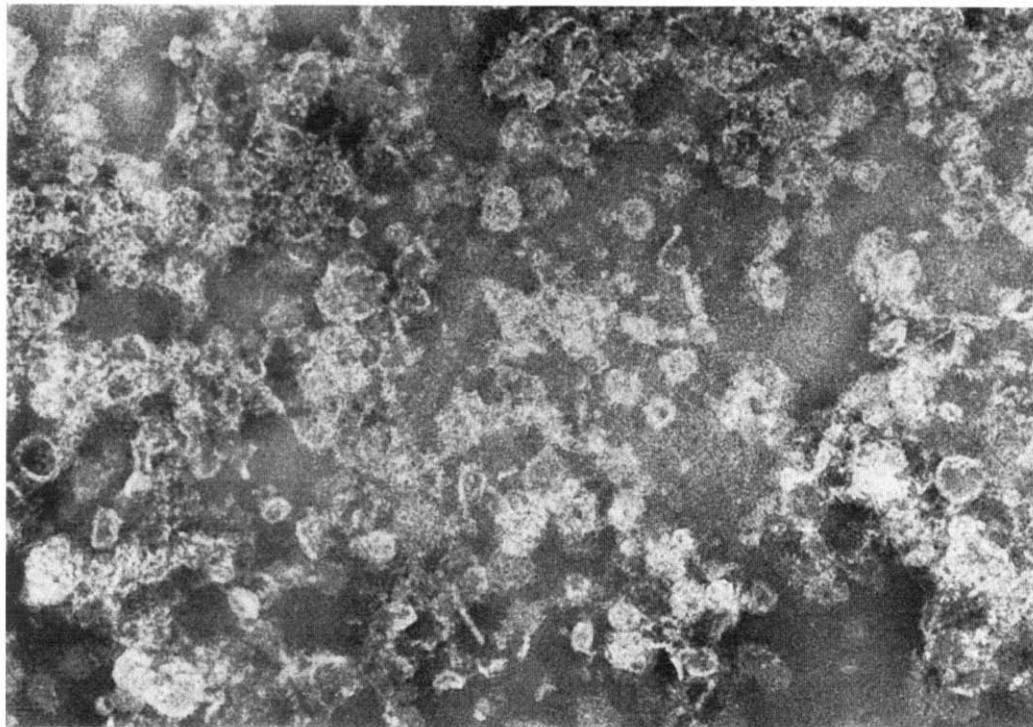


Fig. 10. Die Partikeln der leichten pigmentierten Bande des Ficoll-Gradienten (Präparation vergl. Fig. 3) ($\times 140\,000$)

Disc-Elektrophorese. Auch mit dieser Methode lassen sich zwei Komponenten der leichten Bande nachweisen. Eine rot gefärbte Zone dringt bei einer Gelkonzentration von 5.6 % nur geringfügig in die Säule ein (Fig. 8b). Daneben tritt eine proteinhaltige ungefärbte Zone im oberen Teil der Säule neben sehr schwach ausgebildeten Proteinzenen auf.

Agar-Gelelektrophorese. In einem 0.5 %igen Ionagar konnte deutlich die Wanderung der roten Zone aus der leichten Bande beobachtet werden (Fig. 11). Wie in der disc-Elektrophorese wanderte eine ungefärbte Proteinzone 2 vor der roten Zone 1. Nur in der roten Zone sind neben Proteinen, Lipide und Succinat-Dehydrogenaseaktivität nachweisbar. Für die leichte Bande aus aeroben Dunkelkulturen ergab sich das gleiche Zonenbild.

Gelelektrophorese unter Einwirkung von Phenol-Ameisensäure. Im Gegensatz zur Thylakoidfraktion zeigt die in Phenol-Ameisensäure gelöste und gelelektrophoretisch aufgetrennte leichte Bande im densitometrisch vermessenen Pherogramm nur eine Hauptzone (Fig. 12). Diese Zone entspricht der Zone C im Diagramm der schweren Bande (Fig. 9). Das gleiche Diagramm wie Fig. 12 zeigen Pherogramme, in denen Material aus der leichten Bande von aeroben Dunkelkulturen gelelektrophoretisch getrennt wurde.

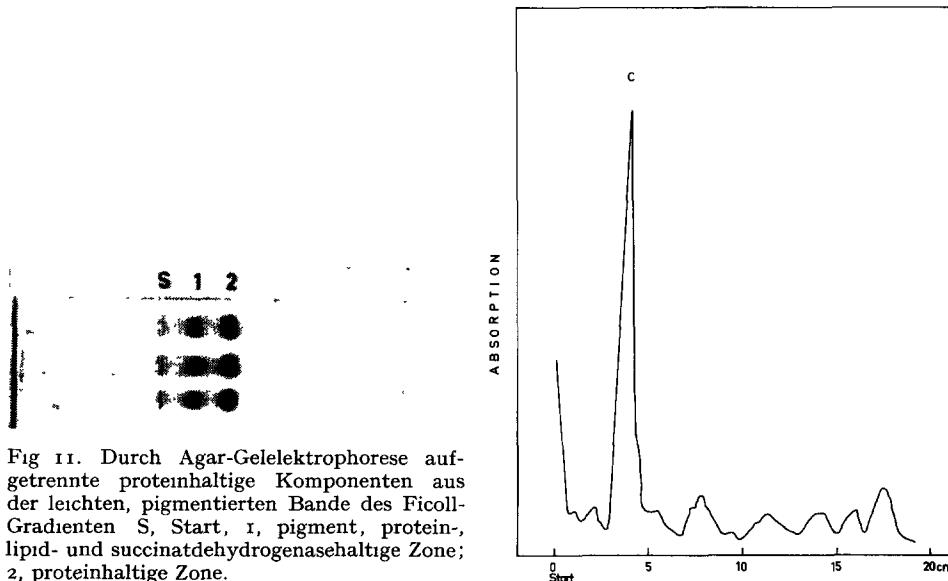


Fig. 11. Durch Agar-Gelelektrophorese aufgetrennte proteinhaltige Komponenten aus der leichten, pigmentierten Bande des Ficoll-Gradienten S, Start, 1, pigment, protein-lipid- und succinatdehydrogenasehaltige Zone; 2, proteinhaltige Zone.

Fig. 12. Pherogramm der in Phenol-Ameisensäure-Wasser zerlegten leichten pigmentierten Bande des Ficollgradienten (Préparation vergl. *METHODEN* und Fig. 4, Zeichen im Text erklärt). Absorption bei 644 nm.

DISKUSSION

Die bei $313934 \times g$ (60 Min) sedimentierenden Partikeln aus Homogenaten pigmentierter Zellen von *R. rubrum* lassen sich durch Dichtegradientenzentrifugation in zwei gefärbte Banden auftrennen. Die leichtere Bande fehlt, wenn bei der Vorrzentrifugation nur im Schwerfeld von $54491 \times g$ (60 Min) gearbeitet wird (Fig. 2). Beide Banden treten auch nur dann auf, wenn die Aggregation von Membranen unter dem Einfluss von Mg^{2+} (Lit. 19, 20) vermieden wird (Fig. 4). Ein Zusatz von EDTA zum Puffersystem ermöglicht durch Bindung von Mg^{2+} eine Verringerung der ribosomalen Verunreinigungen (Fig. 5). Die im Ficoll-Gradienten isolierten Banden sind nicht mit den beiden Banden identisch, die in einem Saccharose-Gradienten erhalten werden können²³. In der leichten Bande des Saccharose-Gradienten befinden sich überwiegend Thylakoide, während die schwere Bande neben Thylakoiden grobe Zelltrümmer und Teile der cytoplasmatischen Membran enthält^{24, 25}.

Die Untersuchungen der schweren Bande aus dem Ficoll-Gradienten zeigen, dass es sich—im Gegensatz zu der entsprechenden Bande aus dem Saccharose-Gradienten—um eine recht einheitliche, aus Thylakoiden bestehende Fraktion handelt. Als

Kriterium für die Reinheit der Thylakoidbande dienen die Daten aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Fig. 6), aus der analytischen Ultrazentrifugation (Fig. 7) und aus der disc-Elektrophorese (Fig. 8a). Während durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen und die analytische Ultrazentrifugation nachgewiesen werden kann, dass keine groben Membranverunreinigungen neben den Thylakoiden in der Fraktion vorhanden sind, spricht das Ergebnis der disc-Elektrophorese gegen die Existenz kleinerer Zellbestandteile.

Da jedoch chemische Nachweise für die Anwesenheit von spezifischen Zellwandbausteinen nicht durchgeführt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass lösliche Bestandteile der Zellwand den Thylakoiden anhaften.

Die leichte Bande enthält, wenn sie aus pigmenthaltigen Zellen isoliert wird, ebenfalls bacteriochlorophyll-tragende Strukturen. Neben den pigment-, lipoprotein- und Succinatdehydrogenase-haltigen Membrankomponenten, die den Hauptanteil bilden, ist in der leichten Bande nach der Agar-Gelelektrophorese noch eine Proteinfaktion nachzuweisen (Fig. 11). Das Vorhandensein von Membranen in der leichten Fraktion lässt sich durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigen (Fig. 10). Zusätzlich befinden sich aber noch andere Partikeln in dieser Fraktion. Die Membranen lagern sich, wie schon häufiger beobachtet^{20,26}, nach der mechanischen Abtrennung wieder zu vesikelartigen Strukturen um. Nach Lösung in Phenol-Ameisensäure und anschließender Elektrophorese ergibt die leichte Bande eine aus mindestens zwei sehr dicht nebeneinander liegenden Zonen bestehende Hauptzone C, die nach Vergleichen mit den von BIEDERMANN UND DREWS¹⁰ publizierten Pherogrammen der cytoplasmatischen Membran zuzuordnen ist (Fig. 12). Die Möglichkeit, die leichte Bande auch aus den thylakoidfreien aeroben Dunkelkulturen und aus der thylakoidarmen Mutante M 46 von *R. rubrum* zu isolieren, spricht ebenfalls dafür, dass diese Bande des Ficoll-Gradienten vorwiegend aus der cytoplasmatischen Membran besteht. Gleichzeitig wird damit aber auch der Einwand widerlegt, dass das Material der leichten Bande während der mechanischen Zerstörung der Zellen aus Thylakoiden gebildet wird.

Es fällt auf, dass im Diagramm der durch Elektrophorese in Phenol-Ameisensäure aufgetrennten Thylakoid-Proteine auch die Zone C auftaucht (Fig. 9), die oben als typisch für die cytoplasmatische Membran angesehen wurde. Die erwähnten Reinheitskriterien für die Thylakoid-Fraktion und bisher unveröffentlichte Ergebnisse aus unserem Institut sprechen dafür, dass die Proteine der Zone C und damit Teile der cytoplasmatischen Membran am Aufbau der Thylakoide beteiligt sind. Zu dem gleichen Befund kommen GORCHEIN, NEUBERGER UND TAIT²⁷ nach Untersuchung der Lipide aus unpigmentierten und pigmentierten Zellen von *Rps. sphaeroides*. Für eine strukturelle Verwandtschaft zwischen cytoplasmatischer Membran und den Thylakoiden spricht zusätzlich, dass nicht nur in den Thylakoiden, sondern auch in der cytoplasmatischen Membran aus anaeroben Lichtkulturen von *R. rubrum* Bacteriochlorophyll und Carotinoide eingelagert sind.

DANK

Die Autoren danken Frau Professor Dr. E. Freund-Mölbert und Herrn Dr. W. W. Franke für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen und Fr. Kochanowsky für die Läufe in der analytischen Ultrazentrifuge. Die vorliegende Mitteilung enthält

Teile einer Dissertation vorgelegt von J. O. in Freiburg i. Br. Die Untersuchungen wurden durch Beihilfen der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Durch Zonenzentrifugation in einem Ficoll-Gradienten können aus anaeroben Lichtkulturen von *R. rubrum* zwei pigmenthaltige Banden isoliert werden.
2. Die schwere Bande enthält Thylakoide. Die Experimente weisen darauf hin, dass die Thylakoide in dieser Bande bereits nach einmaliger Gradienten-Zentrifugation in hochgereinigter Form vorliegen.
3. Die leichte Bande besteht überwiegend aus rundlichen Partikeln mit einem mittleren Durchmesser von 360 Å neben kleinen, länglichen Partikeln.
4. Durch Elektrophorese in 0,5 % Agar kann die leichte Bande in zwei Zonen zerlegt werden. In der schneller laufenden Zone lassen sich lediglich Proteine nachweisen. Die langsamere Zone dagegen enthält neben Proteinen auch die Pigmente, Lipide sowie Aktivität der Succinat-Dehydrogenase.
5. Die Thylakoide bestehen nach Lösung in Phenol-Ameisensäure und Elektrophorese in Polyacrylamidgel aus 4 thylakoidspezifischen Proteinkomponenten und einer für die cytoplasmatische Membran charakteristischen Zone C.
6. Die Fraktion C konnte als Hauptkomponente der leichten Bande nachgewiesen werden.
7. Eine der leichten roten Bande aus anaeroben Lichtkulturen entsprechende Fraktion lässt sich aus aeroben Dunkelkulturen und aus der carotenoidlosen, thylakoidarmen Mutante M 46 von *R. rubrum* isolieren.
8. Es wird geschlossen, dass die leichte pigmentierte Bande überwiegend aus Teilen der cytoplasmatischen Membran besteht. Die Gemeinsamkeit von Strukturkomponenten in der leichten und in der schweren Bande spricht dafür, dass die cytoplasmatische Membran in den Aufbau der Thylakoide einbezogen wird.

LITERATUR

- 1 G COHEN-BAZIRE UND R. KUNISAWA, *J Cell Biol*, 16 (1963) 401.
- 2 A W FRENKEL, *J Am Chem Soc*, 76 (1954) 5568.
- 3 J. LASCELLES, IN A H ROSE UND J F. WILKINSON, *Advances in Microbial Physiology*, Academic Press, New York, 1968, p I.
- 4 H K SCHACHMANN, A. B. PARDEE UND R. Y. STANIER, *Arch. Biochem Biophys*, 38 (1952) 245.
- 5 W MENKE, *Ann. Rev. Plant Physiol*, 13 (1962) 27.
- 6 G DREWS UND P GIESBRECHT, *Zentr Bakteriol, Parasitenk. Abt. I Orig.*, 190 (1963) 508.
- 7 P GIESBRECHT UND G DREWS, *Arch Mikrobiol*, 43 (1962) 152.
- 8 E. S. BOATMAN UND H C DOUGLAS, *J Biophys. Biochem Cytol*, 11 (1961) 469.
- 9 H D. TAUSCHEL UND G DREWS, *Arch Mikrobiol.*, 59 (1967) 381.
- 10 M BIEDERMANN UND G. DREWS, *Arch Mikrobiol*, 61 (1968) 48.
- 11 M R J. SALTON, *Ann Rev Microbiol*, 21 (1967) 417.
- 12 G DREWS, *Arch Mikrobiol*, 51 (1965) 186.
- 13 G DREWS UND J. OELZE, *Zentr Bakteriol Parasitenk. Abt. II*, 120 (1965) 1.
- 14 M BIEDERMANN, G. DREWS, R MARX UND J SCHRODER, *Arch. Mikrobiol.*, 56 (1967) 133.
- 15 B J DAVIS, *Ann. N.Y. Acad Sci*, 121 (1964) 404.
- 16 G. BRAUNITZER UND G. BAUER, *Naturwissenschaften*, 54 (1967) 70.
- 17 R. HESS UND R M DIETRICH, *J. Biophys Biochem Cytol*, 8 (1960) 546.
- 18 H J. SCHICK UND G. DREWS, *Biochim Biophys. Acta*, im Druck.
- 19 K. D. GIBSON, *Biochemistry*, 4 (1965) 2027.
- 20 D F. H. WALLACH, V B. KAMAT UND M H. GAIL, *J Cell Biol*, 30 (1966) 601.

- 21 A. ARONSON, *J. Mol. Biol.*, 15 (1966) 505.
- 22 M. L. PETERMANN, *The Physical and Chemical Properties of Ribosomes*, Elsevier, Amsterdam, 1964.
- 23 G. COHEN-BAZIRE UND R. KUNISAWA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S.*, 46 (1960) 1543.
- 24 P. B. WORDEN UND W. R. SISTROM, *J. Cell Biol.*, 23 (1964) 135.
- 25 S. C. HOLT UND A. G. MARR, *J. Bacteriol.*, 89 (1965) 1413.
- 26 M. R. J. SALTON UND J. A. CHAPMAN, *J. Ultrastruct. Res.*, 6 (1962) 489.
- 27 A. GORCHEIN, A. NEUBERGER UND G. H. TAIT, *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B*, 170 (1968) 311.

Biochim. Biophys. Acta, 173 (1969) 436-447