ETH zürich

ETH Library

Studies on the structure and function of the bacteriochlorophyll C antenna complex of the chlorosomes from the phototrophic bacterium Chloroflexus aurantiacus

the pigment-binding function of the 5.7 kDa polypeptide

Doctoral Thesis

Author(s):
Lehmann, Rainer Patrick

Publication date:
1994

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-000959304

Rights / license:
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

This page was generated automatically upon download from the ETH Zurich Research Collection.
For more information, please consult the Terms of use.

Diss. ETH ex. B

Diss. ETH No 10687

STUDIES ON THE STRUCTURE AND FUNCTION OF THE BACTERIOCHLOROPHYLL *C* ANTENNA COMPLEX OF THE CHLOROSOMES FROM THE PHOTOTROPHIC BACTERIUM *CHLOROFLEXUS AURANTIACUS*:

The pigment-binding function of the 5.7 kDa polypeptide

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY

for the degree of

DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by

Rainer Patrick Lehmann

Dipl. Biol.
born 25th May 1965
citizen of Germany

ETH-BIBLIOTHEK ZÜRICH
CatE

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. H. Zuber, examiner
Prof. Dr. J. Oelze, co-examiner

1994

H. Zuber

12. Juli 1994

Summary

Green photosynthetic bacteria are characterized by the presence of extramembrane light-harvesting systems, the chlorosomes. The chlorosomes are designed to absorb light in the near infra-red region and to transfer the absorbed energy to other components of the photosynthetic apparatus and ultimately to the photochemical reaction centre. The chlorosomes of the thermophilic gliding bacterium *Chloroflexus aurantiacus* are oblong vesicles of 110 x 30 x 12 nm^3 that are attached to the inner side of the cytoplasmic membrane. They comprise the antenna pigment bacteriochlorophyll *c* (in the range of 10000 BChl *c* molecules per chlorosome), small amounts of bacteriochlorophyll *a* (BChl *a*), three to four major polypeptides, lipids and carotenoids. The polypeptides have apparent molecular weights of 5700, 5800, 11000 and 18000 according to sodium dodecylsulfate polyacrylamide gelelectrophoresis (SDS-PAGE). The 5.7 kDa polypeptide is the predominant protein component, which is thought to be associated with the BChl *c* in the chlorosomes. It may form a pigment-protein complex with BChl *c* and thus influence the spectral properties of the pigment, i.e. cause the red shift and the hyperchromicity.

Due to their chemical structure BChl *c* molecules interact in nonpolar organic solvents, showing strikingly similar spectral properties as BChl *c* in the hydrophobic environment of the chlorosome interior. Hence, the question arises, whether the characteristic absorption, fluorescence and circular dichroism spectra of the chlorosomes result from chromophore-protein or from chromophore-chromophore interactions.

The present investigation was based on the working hypothesis that BChl *c* in the chlorosomes of *Chloroflexus aurantiacus* is organized in pigment-protein complexes involving the 5.7 kDa polypeptide. The study aimed at providing experimental evidence for this hypothesis. Above that, it attempted to elucidate the role of the other polypeptides in the chlorosome. To this end, a thorough polypeptide analysis was carried out. The 5.7 kDa polypeptide, whose amino acid sequence was known, and the 11 and 18 kDa polypetide were isolated in a one-step isolation technique using reverse phase high performance liquid chromatography. The exact molecular masses of the polypeptides were determined by mass spectrometry. For the 5.7 kDa polypeptide the molecular weight deduced from the amino acid sequence was confirmed. Furthermore, several proteins of low abundance were partly sequenced by separation on SDS-PAGE, subsequent electro-blotting onto PVDF membrane and automated Edman degradation.

Structure and function of the protein components were correlated by means of limited proteolysis of chlorosome suspensions and analysis of spectral changes exerted by the enzymatic digestion. It was shown that the proteolytic treatment had only little effect on the absorption spectrum of the chlorosomes, whereas the changes in rotational strength

(CD spectra) were considerable. The susceptibility of the chlorosomes to proteolytic treatment was enhanced by partly dissociating the BChl *c* antenna with the long-chain alcohol 1-hexanol. Enzymatic digestion under these conditions resulted in a drastic increase in rotational strength indicating strong intermolecular coupling of BChl *c* molecules. By comparison of the effects of different proteases, namely trypsin and proteinase K, it was shown that the 5.7 kDa polypeptide played a major role in the organization of the pigments. The other proteins appeared not to be associated with BChl *c*.

In addition, different growth conditions for the culture of *Chloroflexus aurantiacus* were employed. Cells cultivated under low light conditions on complex growth medium possessed chlorosomes with a higher BChl *c* to protein ratio than cells grown under high light intensity on nutrient-limited medium. Limited proteolysis and spectral analysis were carried out with low light and high light chlorosomes and both were compared. The difference in the intensity of the CD signals and the differing response to proteolytic treatment led to the conclusion that in both types of chlorosomes BChl *c* aggregates were associated with the 5.7 kDa polypeptide and that the size of the BChl *c* aggregates was variable.

The data obtained in the course of the present study indicated that the BChl *c* antenna in the chlorosomes of *Chloroflexus aurantiacus* was constituted of pigment-protein complexes involving the 5.7 kDa polypeptide and a variable amount of BChl *c* molecules, probably in an oligomeric arrangement. As a consequence the spectral properties of the BChl *c* antenna pigments (red shift and hyperchromicity) may be due to protein-chromophore as well as chromophore-chromophore interactions.

Zusammenfassung

Die grünen photosynthetischen Bakterien besitzen als gemeinsames Merkmal außerhalb der cytoplasmatischen Membran gelegene Lichtsammelsysteme, sog. Chlorosomen. Die Funktion der Chlorosomen ist die Absorption von Licht im nahen Infrarotbereich, sowie die gerichtete Weiterleitung der Energie auf andere Komponenten des Photosyntheseapparates. Die Energie gelangt letztlich zum photosynthetischen Reaktionszentrum. Die Chlorosomen des thermophilen, gleitenden Bakteriums *Chloroflexus aurantiacus* sind langgestreckte Vesikel mit den Dimensionen 110 x 30 x 12 nm^3, die auf der Innenseite der cytoplasmatischen Membran angelagert sind. Sie beinhalten das Antennenpigment Bakteriochlorophyll *c* (ca. 10000 BChl *c* Moleküle pro Chlorosom), kleine Mengen von Bakteriochlorophyll *a* (BChl *a*), drei bis vier vorherrschende Proteine, Lipide und Karotinoide. Die Polypeptide haben apparente Molekulargewichte von 5700, 5800, 11000 und 18000, bestimmt mittels Natrium Dodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Das 5,7 kDa Polypeptid ist das am häufigsten auftretende Protein, von dem angenommen wird, daß es mit BChl *c* in den Chlorosomen assoziiert ist. Es könnte einen Pigment-Protein Komplex mit BChl *c* bilden und auf diese Weise die spektralen Eigenschaften des Pigments beeinflussen, d.h. die Rotverschiebung sowie die Hyperchromizität.

Aufgrund ihrer chemischen Struktur sind BChl *c* Moleküle in der Lage in unpolaren organischen Lösungsmitteln miteinander zu interagieren. Sie zeigen dort erstaunlich ähnliche spektrale Eigenschaften wie BChl *c* in den Chlorosomen. Daher stellt sich die Frage, ob die charakteristischen Absorptions-, Fluoreszenz- und Zirkular Dichroismus Spektren durch Chromophor-Protein oder Chromophor-Chromophor Wechselwirkungen hervorgerufen werden.

Die vorliegende Untersuchung wurde auf der Hypothese aufgebaut, daß BChl *c* in den Chlorosomen von *Chloroflexus aurantiacus* mit dem 5,7 kDa Polypeptid in Pigment-Protein Komplexen organisiert ist. Mit der Untersuchung wurde beabsichtigt experimentelle Beweise für diese Hypothese zu finden. Darüber hinaus wurde versucht die Funktion der anderen Chlorosomenproteine zu erhellen. Zu diesem Zweck wurde eine sorgfältige Proteinanalyse durchgeführt. Das 5,7 kDa Polypeptid, dessen Aminosäuresequenz bekannt war, sowie das 11 und das 18 kDa Polypeptide wurden mittels Umkehrphasen-Chromatographie im HPLC System isoliert. Die genauen Molekularmassen der Polypeptide wurden mittels Massenspektrometrie bestimmt. Für das 5,7 kDa Polypeptid konnte das von der Aminosäuresequenz abgeleitete Molekulargewicht bestätigt werden. Darüber hinaus wurden die Sequenzen von mehreren weniger stark vertretenen Chlorosomenproteinen teilweise bestimmt durch Auftrennung

über SDS-PAGE, nachfolgendes Elektro-Blotting auf PVDF-Membran und automatisierten Edman-Abbau.

Struktur und Funktion der Proteinkomponenten wurden korrelliert mittels limitierter Proteolyse an Chlorosomensuspensionen und Analyse der spektralen Veränderungen infolge des enzymatischen Verdaus. Es wurde gezeigt, daß die proteolytische Behandlung nur wenig Einfluß auf das Absorptionsspektrum der Chlorosomen hatte, die zirkular dichroistischen Eigenschaften jedoch stark veränderte. Die Empfindlichkeit der Chlorosomen gegenüber proteolytischer Behandlung wurde verstärkt durch teilweise Dissoziierung der BChl *c* Antenne mit dem langkettigen Alkohol 1-Hexanol. Unter diesen Bedingungen führte der enzymatische Verdau zu einem drastischen Ansteigen des CD Effektes, ein Hinweis auf starke intermolekulare Kopplung zwischen BChl *c*-Molekülen. Durch Vergleich der Effekte der Proteasen Trypsin und Proteinase K, wurde gezeigt, daß dem 5,7 kDa Polypeptid eine entscheidende Rolle bei der Organisation der Pigmente zukommt. Die anderen Polypeptide schienen nicht mit BChl *c* assoziiert zu sein.

Zusätzlich wurden verschiedene Wachstumsbedingungen für die Kultur von *Chloroflexus aurantiacus* angewandt. Zellen, die unter Schwachlichtbedingungen auf komplexem Medium kultiviert wurden, besaßen ein höheres BChl *c*/Protein Verhältnis als Zellen, die unter Starklichtbedingungen auf nährstoff-limitiertem Medium kultiviert wurden. Limitierte Proteolyse und spektrale Analyse wurde vergleichend in Schwachlicht und Starklichtkulturen durchgeführt. Die Unterschiede in der Intensität des CD-Signals, sowie das unterschiedliche Verhalten bei proteolytischem Abbau führte zu dem Schluß, daß in beiden Arten von Chlorosomen BChl *c*-Aggregate mit dem 5,7 kDa Polypeptid assoziiert sind und daß die Größe der BChl *c*-Aggregate variierte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung brachten deutliche Hinweise darauf, daß die BChl *c*-Antenne in den Chlorosomen von *Chloroflexus aurantiacus* aus Pigment-Protein Komplexen aufgebaut ist. Diese bestehen aus dem 5,7 kDa Polypeptid und einer variablen Anzahl von BChl *c*-Molekülen, wahrscheinlich in oligomerer Anordnung. Daraus folgt, daß die spektralen Eigenschaften der BChl *c*-Antennenpigmente (Rotverschiebung und Hyperchromiziät) wahrscheinlich sowohl durch Protein-Chromophor wie auch durch Chromophor-Chromophor Wechselwirkung hervorgerufen werden.