

Abschlussbericht über das von der Max-Buchner-Forschungstiftung vom 01.07.2007 bis 30.06.2009 geförderte Projekt:

Kennziffer 2759:

ENTWICKLUNG EINER MIKROBIOLOGISCHEN METHODE ZUR DETEKTION OXIDATIV WIRKENDER ZELLGIFTE UND ZUM SCREENING ANTIOXIDATIVER RADIKALFÄNGER MIT HILFE EINER *RHODOSPIRILLUM RUBRUM* MUTANTE

Prof. Dr. Robin Ghosh, Abteilung Bioenergetik, Biologisches Institut, Universität Stuttgart.

Abstract:

Eine *Rhodospirillum rubrum* Mutante, GPUHB1, die eine stark erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff-Stress zeigte, wurde charakterisiert und die molekularen Ursachen ihrer Sauerstoffempfindlichkeit untersucht. Sie soll als Nachweisorganismus in Wirkstoff-Screening-Reihen eingesetzt werden, bei denen neu entwickelte (bio-)chemische Substanzen darauf getestet werden, ob sie in lebenden Organismen zu einer vermehrten Bildung schädlicher reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beitragen.

Im Zuge des hier beschriebenen Projektes sollte ein einfacher und kostengünstiger mikrobiologischer Test zur Detektion hoch reaktiver Sauerstoffverbindungen (*reactive oxygen species*; ROS, z. B. Superoxid, Wasserstoffperoxid, das Hydroxylradikal oder Singulett-Sauerstoff) entwickelt werden. ROS sind in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus verschiedenster Wissenschaftsbereiche - z. B. der Krebsforschung oder der Erforschung von Alterungsprozessen - gerückt (z. B. [1-3]). Sie schädigen Zellen irreversibel durch Oxidation von DNA, Proteinen und Lipidmembranen und initiieren durch eine Verschiebung des Redoxzustands der Zellen Signalkaskaden, was letztlich zum Zelltod, d. h. vorzeitigen Alterungsprozessen, oder auch zu unkontrollierten Zellteilungen, d. h. Krebs, führen kann. In unseren Zellen entstehen ROS durch unvermeidbare Seitenreaktionen während der Energie-liefernden Prozesse der Atmungskette. Sie können jedoch mit Hilfe endogener Enzyme (z. B. Superoxid-Dismutase, Katalase) entgiftet werden. Doch durch Aufnahme von Umweltgiften (Abgase, Feinstaub, Zigarettenrauch) aber auch aufgrund anderer Stress erzeugender Umstände, wird unser Organismus mehr und mehr erhöhten ROS-Konzentrationen ausgesetzt, die nicht mehr ausreichend entgiftet werden können, was zu massiven Gesundheitsbeeinträchtigungen führen kann.

Im hier beschriebenen Projekt wurde eine auf Sauerstoff-Stress extrem empfindlich reagierende Mutante des phototrophen Bakteriums *Rhodospirillum rubrum*, GPUHB1 (bzw. deren carotinoidhaltiges, und daher etwas weniger empfindliches Analog SPUHB15), genauer

charakterisiert, und es wurde geprüft, ob sie das Potential besitzt als Nachweisorganismus für ROS im Zuge einer einfachen und kostengünstigen mikrobiellen Nachweismethode dienen zu können. Ziel der Nachweismethode sollte sein, neu entwickelte (bio-)chemische Substanzen darauf zu testen, ob sie in lebenden Organismen zu einer vermehrten, schädlichen ROS-Bildung beitragen. Außerdem sollte nach Wirkstoffen gescreent werden, die, ähnlich wie der Radikalfänger Vitamin C, zur ROS-Entgiftung beitragen können.

GPUHB1 und SPUHB15 waren durch Deletion des *puhB*-Gens aus dem *puh*-Operon der *R. rubrum* Parentalstämme G9 (carotinoidlos) bzw. S1 (carotinoidhaltig) erzeugt worden [4]. *R. rubrum* gehört zur Familie der schwefelfreien Purpurbakterien (Rhodospirillaceae), deren Mitglieder sich dadurch auszeichnen, dass sie ihren Stoffwechsel auf die unterschiedlichsten Wachstumsbedingungen einstellen können. Unter anaeroben, phototrophen Bedingungen kann *R. rubrum* anoxygene Photosynthese betreiben. Im Dunkeln können bei Abwesenheit von Sauerstoff Gärprozesse ablaufen, und wenn Sauerstoff vorhanden ist, gewinnt *R. rubrum* Energie durch die Reaktionen der oxidativen Phosphorylierung. Ein großer Vorteil von *R. rubrum* bei seiner Verwendung in industriellen Produktionsprozessen ist der, dass es bei Inkubation in einem speziellen Medium, M2SF [5], unter semi-aeroben Bedingungen (d. h. Sauerstoff-Partialdruck pO_2 von weniger als 0,5 %) im Dunkeln sehr große Mengen an inneren Membranen produzieren kann, welche sonst nur unter photosynthetischen Bedingungen erreicht werden können. Die Mechanismen zur Regulation der Expression der photosynthetischen Gene und der dadurch bewirkten Assemblierung des photosynthetischen Apparates (Abbildung 1), welcher seinerseits das Wachstum der photosynthetischen Membranen induziert, werden zur Zeit intensiv erforscht. Auch die hier beschriebenen Mutanten GPUHB1 und SPUHB15 waren ursprünglich konstruiert worden, um den postulierten Einfluss des *puh*-Operons [6,7] auf die Assemblierung des photosynthetischen Apparates, der aus einem Lichtsammelkomplex (LH1) besteht, der ein Reaktionszentrum (RC) ringförmig umschließt, genauer zu untersuchen.

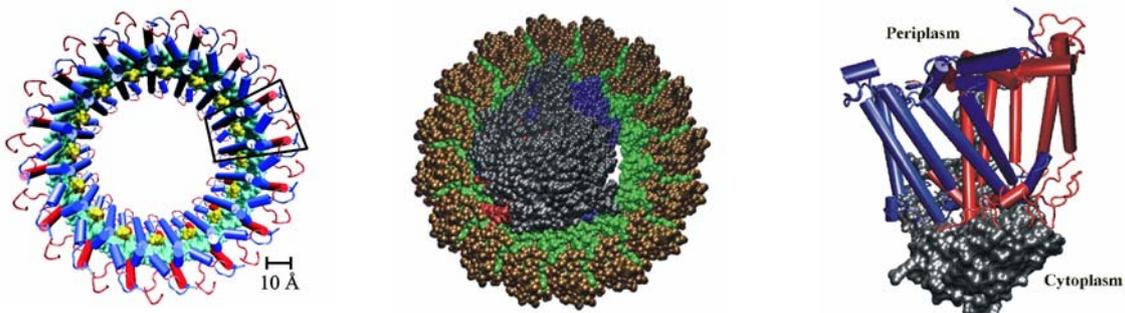


Abb. 1. Aktuelles Modell des photosynthetischen Apparates (PSU) von *R. rubrum*, das während einer Kooperation der Arbeitsgruppe (AG) Ghosh mit der AG Schulten (Urbana-Champaign, USA) erstellt wurde. Für diese Moleküldarstellungen wurde das Programm VMD [8] verwendet. (**links**) LH1-Komplex. Die 2 verschiedenen Polypeptidketten-Typen, α und β , sind in blau bzw. rot, die Cofaktoren in grün (Bacteriochlorophylle) und gelb (Carotinoide) dargestellt. (**mitte**) Blick auf die cytoplasmatische Seite der LH1-RC-PSU. (**rechts**) RC-Seitenansicht: dargestellt sind nur die 3 Proteinuntereinheiten, H-UE grau, M rot, L blau.

Während der Zell-Anzucht und der phänotypischen Charakterisierung der *puhB*⁻-Mutanten fiel auf, dass diese überraschenderweise sehr Sauerstoff-Stress-empfindlich waren. Während semi-aerober Inkubation im Dunkeln konnte beobachtet werden, dass bereits nach wenigen (3 bis 4) Überimpfungen sich die anfangs purpurfarbenen SPUHB15-Kulturen orange färbten und die anfangs blau-grünen GPUHB1-Kulturen braun wurden. Es konnte nachgewiesen werden, dass dieser Farbumschlag durch die Anhäufung von Sekundärmutanten verursacht worden war, die in Anwesenheit von Sauerstoff einen großen Selektionsvorteil gegenüber den ursprünglichen Mutanten und sogar dem Wildtyp hatten. Während der Messung anaerober, phototropher Wachstumskurven der carotinoidlosen (und daher noch empfindlicheren) Mutante GPUHB1 konnte außerdem beobachtet werden, dass die während der Messung eingebrachte kleine Menge Luft toxisch auf die Zellen wirkte - die GPUHB1-Kulturen hörten auf zu wachsen und viele Zellen starben ab. Nur wenn die GPUHB1-Kulturen etwa 6 Tage lang ohne Messung und damit verbundene Luftzufuhr inkubiert wurden und dabei eine $OD_{660}^{1\text{cm}}$ (ein Maß für die Zelldichte in der Kultur) von etwa 0,6 erreichen konnten, konnte ein mit dem carotinoidhaltigen Stamm SPUHB15 vergleichbares Wachstumsverhalten beobachtet werden. Wahrscheinlich war bei einer OD von 0,6 eine genügend hohe Zelldichte erreicht worden, so dass der bei der Messung eingeführte Sauerstoff schnell veratmet werden konnte und die Zellen sich auch gegenseitig Schatten geben konnten und somit vor zu hohen Lichtintensitäten geschützt waren („*self-shading*“). Die Messung der Oxidase-Aktivität von GPUHB1- und SPUHB15-Zellen mit Hilfe eines Schnelltests (SpotTestTM von DIFCO) und des Sauerstoff-Indikators Resazurin zeigte eine erhöhte Oxidase-Aktivität (als Reaktion auf den Sauerstoff-Stress) in den Mutanten im Vergleich zu ihren Parentalstämmen. Die mit diesen Experimenten bestätigte erhöhte Sauerstoffempfindlichkeit von GPUHB1 und SPUHB15 sollte im Zuge des von der Max-Buchner-Forschungstiftung geförderten Projekts für eine Sauerstoff-Stress-Nachweismethode genutzt werden.

Zunächst wurde in den im Folgenden zusammengefassten Experimenten der **Grad der Sauerstoffempfindlichkeit** von GPUHB1 im Vergleich zu dessen Parentalstamm G9 **quantifiziert** und der **Ort der durch ROS erzeugten Schäden aufgeklärt**. In den

Experimenten wurden aufgereinigte, gewaschene photosynthetische Membranen, Chromatophoren genannt, mit verschiedenen Stressoren inkubiert und das Ausmaß der Schädigung spektroskopisch bestimmt. (In Absorptionsspektren von GPUHB1- und G9-Chromatophoren zeigt die Höhe des Peaks bei 873 nm die Konzentration an intakten Lichtsammelkomplexen an und die Höhe des Peaks bei 802 nm die Konzentration an Reaktionszentren.) Wenn die Chromatophoren-Suspensionen 3 Stunden lang bei 30°C unter Wolfram-Licht in Anwesenheit von Luftsauerstoff inkubiert wurden, so war eine Degradation der GPUHB1- und G9-LH1-Komplexe von ungefähr 25 % messbar. Das GPUHB1-RC war hingegen nur wenig degradiert worden (um 5 %) während die G9-RCs überhaupt nicht beeinträchtigt waren. Der Grad der Schädigung konnte ungefähr verdoppelt werden, wenn das gleiche Experiment in Anwesenheit von reduziertem Cytochrom c durchgeführt wurde, (das bei den Photosynthese-Reaktionen als Substrat diente,) da nun in einer Nebenreaktion des Cytochrom bc₁-Komplexes die ROS O₂^{•-} gebildet werden konnte. Wenn O₂^{•-} *exogen* durch die Xanthin-Oxidase/Xanthin-Reaktion zugeführt wurde [9], so wurde beim GPUHB1-LH1 nach 20-stündiger Inkubation im Dunkeln bei 30°C eine Degradation von 28 % gemessen, während der G9-LH1 nur um 6 % degradiert war. Die RCs beider Stämme wurden durch das exogen zugeführte O₂^{•-} nicht beeinflusst. Eine 26-stündige Inkubation in Anwesenheit von 1 M H₂O₂ führte zu einer starken (55 %) Degradation des GPUHB1-LH1-Komplexes, die fast doppelt so groß war wie die der G9-LH1-Komplexe. Auch in diesem Experiment waren die RCs beider Stämme vergleichsweise wenig beeinflusst (jeweils nur ca. 25 % Degradation). In Abbildung 2 sind die beschriebenen Ergebnisse graphisch dargestellt. Man kann erkennen, dass in GPUHB1 vor allem die LH1-Komplexe wesentlich empfindlicher gegenüber oxidativem Stress waren als die G9-LH1-Komplexe. Im Parentalstamm schien also **die Anwesenheit des PuhB-Proteins die Integrität des LH1-Komplexes bei exogen zugeführtem Sauerstoff-Stress zu bewahren**. Die RCs beider Stämme wurden hingegen durch Sauerstoff-Stress vergleichsweise wenig beeinflusst.

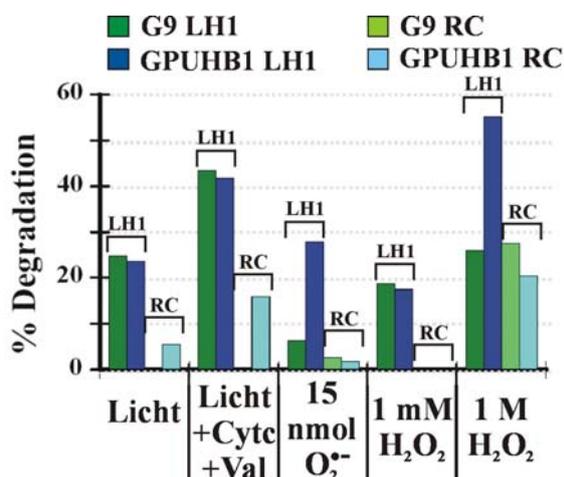


Abb. 2. Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Experimenten zur Quantifizierung der Sauerstoffempfindlichkeit von GPUHB1- und G9-Chromatophoren. Aufgetragen ist die prozentuale Degradation der LH1-Komplexe und der RCs von G9 und GPUHB1 nach Inkubation in Anwesenheit der verschiedenen Stressoren.

Um den **molekularen Ursachen der erhöhten Empfindlichkeit von *puhB*⁻-Mutanten gegenüber Sauerstoff-Stress** herauszufinden, wurden außerdem Experimente zum Nachweis *endogener* O₂⁻-Produktion in Chromatophoren durchgeführt. Hierbei wurde die Methode von McCord und Fridovich (1969, [9]) angewandt, bei der in einer Nachweisreaktion oxidiertes Cytochrom c durch das in der zu untersuchenden Probe produzierte O₂⁻ reduziert wird, was spektroskopisch durch ein Ansteigen der A₅₅₀ nachgewiesen werden kann. Um die durch O₂⁻ verursachte Cytochrom c-Reduktion von anderen in den Membranen stattfindenden Cytochrom c-Redox-Reaktionen unterscheiden zu können, wurden Kontrollexperimente in Anwesenheit des Enzyms Superoxid-Dismutase durchgeführt. Die Analyse der gemessenen O₂⁻-Produktionsraten zeigte, dass **SPUHB15 im Vergleich zu seinem Parentalstamm S1 etwa 1,8 mal mehr O₂⁻ pro Zeiteinheit produzierte.**

Diese leicht erhöhte O₂⁻-Produktionsrate in SPUHB15 konnte jedoch die extreme Sauerstoffempfindlichkeit der *puhB*⁻-Mutanten nicht zufriedenstellend erklären. Vielmehr wurden die im vorigen Abschnitt beschriebenen Experimente zur Quantifizierung der Sauerstoffempfindlichkeit zum Anlass genommen, in weiteren spektroskopischen Experimenten die Integrität des LH1-Komplexes von Mutanten und Wildtyp genauer zu untersuchen. Die Messung von Differenzspektren (Chromatophoren-Spektren im Dunkeln - minus - Spektren während der Beleuchtung mit Anregungslicht geeigneter Wellenlänge (> 820 nm)) zeigte, dass die im LH1-Komplex gebundenen Bacteriochlorophylle in den Mutanten leichter photo-oxidiert werden konnten. **Die LH1-Struktur war also in den *puhB*⁻-Mutanten gestört und daher empfindlicher gegenüber Degradation durch ROS.**

Komplementierungsexperimente der *puhB*⁻-Mutanten mit dem *puhB*-Gen *in trans* (, die hier aus Platzgründen nicht weiter erläutert werden,) bestätigten schließlich die Vermutung, dass das **PuhB-Protein ein integraler struktureller Bestandteil des photosynthetischen Apparates** von *R. rubrum* ist.

Die Mutanten GPUHB1 und SPUHB15 wurden also umfassend charakterisiert und die Ursachen ihrer phänotypischen Besonderheit, d. h. ihrer erhöhten Sauerstoffempfindlichkeit, konnten weitestgehend aufgeklärt werden. Diese sind in einem eingereichten Manuskript detailliert beschrieben [4]. Wachstumsexperimente von Mutanten und Parentalstämmen zeigten positive Effekte der Inkubation mit 10 µM α-Tocopherol (Vitamin E) und 5 mM Ascorbinsäure (Vitamin C). Da die Charakterisierung und Standardisierung der untersuchten Mutanten sehr viel Zeit in Anspruch genommen hatte, konnte bislang die angestrebte Testmethode für ROS-erzeugende und ROS-detoxifizierende

Substanzen noch nicht optimiert und automatisiert werden, was aber im Zuge laufender Projekte in den nächsten Monaten noch geschehen wird.

Referenzen

1. **Bartsch, H., Jagadeesan, N., and Owen, R. W.** 2002. Exocyclic DNA adducts as oxidative stress markers in colon carcinogenesis: potential role of lipid peroxidation, dietary fat and antioxidants. *Biol. Chem.* 383, 915-921
2. **Gotoh, N., and Niki, E.** 1994. Measurement of superoxide reaction by chemiluminescence. *Meth. Enzymol.* 233, 154-160
3. **Weiner, L. M.** 1994. Oxygen radicals generation and DNA scission by anticancer and synthetic quinones. *Meth. Enzymol.* 233, 92-105.
4. **Autenrieth, C., and Ghosh, R.** 2010. The bacterial photosynthetic unit antenna ring interfaces with the PuhB gate protein. *Submitted.*
5. **Ghosh, R., Hardmeyer, A., Thoenen, I., and Bachofen, R.** 1994. Optimization of the Sistro culture medium for large-scale batch cultivation of *Rhodospirillum rubrum* under semi-aerobic conditions with maximal yield of photosynthetic membranes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1698-1700.
6. **Bérard, J., Bélanger, G., and Gingras, G.** 1989. Mapping of the *puh* messenger RNAs from *Rhodospirillum rubrum*. Evidence for tandem promoters. *J. Biol. Chem.* 264, 10897-10903.
7. **Wong, D. K.-H., Collins, W. J., Harmer, A., Lilburn, T. G., and Beatty, J. T.** 1996. Directed mutagenesis of the *Rhodobacter capsulatus puhA* gene and *orf214*: pleiotropic effects on photosynthetic reaction center and light-harvesting 1 complexes. *J. Bacteriol.* 178, 2334-2342.
8. **Humphrey, W. F., Dalke, A., and Schulten, K.** 1996. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14, 33-38.
9. **McCord, J. M., and Fridovich, I.** 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (Hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.