

**Das wasserlösliche Chlorophyll-Protein
(WSCP):
biochemische Charakterisierung und
Untersuchungen zur biologischen Funktion**

Dissertation

zur Erlangung des Grades „Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Inga Bektas (geb. Trostmann)
geb. am 6. Dezember 1976 in Mainz

Mainz, 2010

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 21.04.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Chlorophyll-bindende Proteine höherer Pflanzen	1
1.1.1	ELIPs und SEPs	2
1.2	Wasserlösliche Chlorophyllproteine (WSCPs)	3
1.2.1	Klasse I	3
1.2.2	Klasse II	4
1.3	Abwehr- und Stressreaktionen von Pflanzen	7
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	9
2	Material	10
2.1	Geräte	10
2.2	Chemikalien	12
2.3	Pigmente	13
2.4	Organismen	13
2.5	Proteinlängenmarker	13
2.6	Basenpaarstandards	14
3	Methoden	15
3.1	Biochemische Methoden	15
3.1.1	Isolierung von Chlorophyll aus Erbsenblättern	15
3.1.1.1	Anzucht der Erbsen	15
3.1.1.2	Extraktion der Pigmente (Totalextrakt)	15
3.1.1.3	Trennung von Chlorophyllen und Xanthophyllen mit 1,4-Dioxan	16
3.1.1.4	Präparative HPLC zur Auftrennung von Chl <i>a</i> und Chl <i>b</i>	16
3.1.2	Herstellung von Chlorophyllderivaten	18
3.1.2.1	Herstellung von Chlorophyllid aus Chlorophyll	18
3.1.2.2	Herstellung von Pheophytin und Pheophorbid aus Chlorophyll	19
3.1.3	Pigmentquantifizierung	20
3.1.3.1	Pigmentquantifizierung und -qualitätsanalyse mittels analytischer HPLC	20
3.1.3.2	Photometrische Quantifizierung	21
3.1.4	Isolierung von nativem WSCP aus Blumenkohlblättern	22
3.1.5	Überexpression von rekombinantem WSCP in <i>E.coli</i>	24
3.1.6	Quantifizierung von WSCP	26
3.1.6.1	WSCP-Apoprotein	26
3.1.6.2	Chl-WSCP	26
3.1.7	Bestimmung des Chl/Protein-Verhältnisses der Chl-WSCP-Komplexe	27
3.1.8	Rekonstitution von rekombinantem WSCP	27
3.1.8.1	Standardrekonstitutionsmethode	27
3.1.8.2	Rekonstitution in Lösung	29

3.1.9	Extraktion der WSCP-gebundenen Pigmente	30
3.1.9.1	Pigmentextraktion aus WSCP in Lösung	30
3.1.9.1.1	<i>Qualitative Pigmentextraktion</i>	30
3.1.9.1.2	<i>Quantitative Pigmentextraktion</i>	30
3.1.9.2	Pigmentextraktion aus „grünen“ Polyacrylamid-Gelen	31
3.1.10	Versuche mit rekombinantem WSCP.....	31
3.1.10.1	Chl-Insertion	31
3.1.10.2	Chl/Chlid-Austausch	33
3.1.10.3	Interaktion zwischen WSCP und LHCII	33
3.1.10.3.1	<i>Vorbereitung der LHCII-Probe</i>	34
3.1.10.3.2	<i>Interaktionsversuch</i>	34
3.1.10.4	Interaktion zwischen WSCP und Chlorophyllase	35
3.1.10.4.1	<i>Überexpression und Aufreinigung rekombinanter Chlorophyllase aus Weizen</i> .	36
3.1.10.4.2	<i>Überexpression und Aufreinigung rekombinanter Chlorophyllase aus Arabidopsis</i>	36
3.1.10.4.3	<i>Herstellung von Chlorophyllasepulver aus etiolierten Roggenkeimlingen</i>	36
3.1.10.4.4	<i>Chlorophyllase-Assay</i>	36
3.1.10.4.5	<i>Interaktionsversuch</i>	37
3.1.10.5	Enzyminhibitions-Assays	39
3.1.10.5.1	<i>Trypsin-Assay mit Azocasein</i>	39
3.1.10.5.2	<i>Trypsin-Assay mit L-BAPNA</i>	41
3.1.10.5.3	<i>Papain-Assay</i>	42
3.1.10.5.4	<i>Myrosinase-Assay</i>	43
3.1.10.6	Glucosebindungstest mit Chl-WSCP	47
3.1.11	Proteinextraktion aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	48
3.1.12	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	49
3.1.12.1	SDS-PAGE	51
3.1.12.2	Native PAGE („grünes Gel“).....	51
3.1.12.2.1	<i>Dokumentation der Chl-Fluoreszenz der mittels nativer PAGE aufgetrennten Chl-WSCP-Komplexe</i>	52
3.1.12.3	Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen.....	53
3.1.13	Western Blot	53
3.1.13.1	Elektrotransfer („ <i>blotting</i> “)	54
3.1.13.2	Absättigung der Membran („ <i>blocking</i> “).....	54
3.1.13.3	Proteinmarkierung mit 1. und 2. Antikörper.....	55
3.1.13.4	Detektion des Antikörper-markierten Proteins mittels Chemilumineszenz	55
3.1.14	Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation	55
3.1.14.1	Herstellung von Saccharose-Dichtegradienten.....	56
3.1.14.2	Ultrazentrifugation in Saccharose-Dichtegradienten	56
3.1.15	Spektroskopie	57
3.1.15.1	Absorptionsspektroskopie	57
3.1.15.1.1	<i>Aufnahme von Standard-Absorptionsspektren</i>	57
3.1.15.1.2	<i>Tieftemperatur (77K)-Absorptionsspektroskopie</i>	57
3.1.15.1.3	<i>Zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie</i>	58
3.1.15.2	Circular Dichroismus (CD)-Spektroskopie	58
3.1.15.2.1	<i>Aufnahme von UV/Vis-CD-Spektren</i>	59
3.1.15.2.2	<i>Auswertung der Messdaten der UV-CD-Spektren</i>	60
3.1.15.3	Fluoreszenzspektroskopie	61
3.1.15.3.1	<i>Aufnahme eines Standard-Fluoreszenzspektrums</i>	61
3.1.15.3.2	<i>Tieftemperatur (10K)-Fluoreszenzspektroskopie</i>	61

3.2	Molekularbiologische Methoden	62
3.2.1	Bakterienanzucht	62
3.2.1.1	Flüssigkulturen	62
3.2.1.2	Plattenkulturen	63
3.2.2	Anlegen einer Dauerkultur	63
3.2.3	DNA-Quantifizierung	63
3.2.3.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung	63
3.2.3.2	Quantifizierung mittels Agarose-Gelelektrophorese	64
3.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	64
3.2.4.1	Herstellung von Agarosegelen	65
3.2.4.2	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	65
3.2.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	67
3.2.5.1	Standard-PCR	69
3.2.5.2	Mutagenese-PCR	69
3.2.5.3	„Dirty“-PCR	70
3.2.5.4	Sequenzierungs-PCR	70
3.2.6	DNA-Extraktion und -Aufreinigung	71
3.2.6.1	Aus einem Agarose-Gel	71
3.2.6.2	Aus einem PCR-Ansatz	72
3.2.6.3	Aus einer Bakterienkultur, Plasmidisolierung („Miniprep“)	72
3.2.6.4	Aus <i>Arabidopsis</i> -Pflanzenmaterial	73
3.2.7	Genetische Charakterisierung der Δ WSCP-Mutante	73
3.2.7.1	Verifizierung der tDNA-Insertion/des WSCP-Gen-„knock-outs“	74
3.2.7.2	Test auf Homozygotie	74
3.2.8	Herstellung des WSCP-Klons mBoWSCP _{His}	75
3.2.8.1	Klonierungsstrategie	75
3.2.8.2	Restriktion	76
3.2.8.3	Ligation	78
3.2.8.4	Transformation	78
3.2.8.4.1	Überprüfen des Transformationserfolges	79
3.3	Pflanzenphysiologische Methoden	80
3.3.1	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	80
3.3.2	Sterilisation von <i>Arabidopsis</i> -Samen und Aussaat auf Agarplatten	80
3.3.3	Ergrünungsversuche	81
3.3.4	Starklicht-Stressversuche	81
3.3.4.1	Mit adulten Pflanzen	81
3.3.4.2	Mit Keimlingen	81
3.3.4.2.1	Extraktion der Pigmente aus <i>Arabidopsis</i> -Blattmaterial	82
4	Ergebnisse	83
4.1	Biochemische Charakterisierung von WSCP	83
4.1.1	Isolierung von nativem WSCP aus Blumenkohl	83
4.1.2	Rekombinantes Blumenkohl-WSCP – Optimierung der Rekonstitutionsbedingungen	84
4.1.2.1	Rekonstitutionsversuche mit Inclusion Bodies (IBs) von BoWSCP _{His}	84
4.1.2.2	Rekonstitutionsversuche mit löslichem BoWSCP _{His}	85
4.1.2.2.1	Vergleich verschiedener Rekonstitutionsmethoden mit löslichem BoWSCP _{His}	88
4.1.3	Der neue Klon mBoWSCP _{His}	89
4.1.4	Bestimmung des Chl/Protein-Verhältnisses	89

4.1.5	Bindungsaffinität für Chl <i>a</i> und Chl <i>b</i>	94
4.1.6	Spektroskopische Eigenschaften der gebundenen Chlorophylle	95
4.1.6.1	Einfluss der WSCP-Bindung auf die Chl-Absorptionseigenschaften.....	96
4.1.6.2	Absorptions- und CD-Spektren in Abhängigkeit von Chl <i>a/b</i>	98
4.1.6.3	Energieübertragung zwischen den gebundenen Chlorophyllen.....	100
4.1.6.3.1	<i>Zeitaufgelöste Absorptionsspektren</i>	100
4.1.6.3.2	<i>Tiefemperatur-Fluoreszenzspektren</i>	102
4.1.7	Untersuchungen zur Stabilität von WSCP.....	103
4.1.7.1	Hitzestabilität	103
4.1.7.2	pH-Stabilität.....	105
4.1.7.3	Oligomerisierungsgrad von Chl-, Chlid- und Apo-WSCP in nativer PAGE	106
4.1.8	Chl-/Chlid-Insertions- und Austauschversuche.....	108
4.1.9	Sekundärstruktur von Apo- bzw. Chl-BoWSCP.....	112
4.1.10	Biochemische Untersuchungen zu rekombinantem WSCP aus <i>Arabidopsis thaliana</i> ..	115
4.1.10.1	Chl-Bindungsspezifität von AtWSCP _{His}	115
4.1.10.2	Stabilität von AtWSCP _{His}	118
4.1.10.2.1	<i>Hitzestabilität von Chl-, Chlid, und Pheo-AtWSCP_{His}</i>	118
4.1.10.2.2	<i>Oligomerisierungsgrad von Chl-, Chlid, Pheo- und Apo-AtWSCP_{His} in nativer PAGE</i>	119
4.2	Versuche zur biologischen Funktion von WSCP	121
4.2.1	Genetische Charakterisierung der WSCP-“ <i>knock-out</i> “-Mutante.....	121
4.2.1.1	Verifikation der tDNA-Insertion	121
4.2.1.2	Homozygotietest.....	122
4.2.1.3	Bestimmung der tDNA-Insertionsstelle	122
4.2.2	Physiologische Versuche mit WT und Δ WSCP	123
4.2.2.1	Wachstum	123
4.2.2.2	Ergrünung.....	124
4.2.2.3	Starklicht-Stress.....	124
4.2.3	Natives WSCP aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	127
4.2.3.1	Lokalisation von AtWSCP mittels Western Blot	127
4.2.3.2	Verhalten von AtWSCP in nativer PAGE	129
4.2.4	<i>In vitro</i> Versuche mit rekombinantem BoWSCP	130
4.2.4.1	Wechselwirkung mit LHCIIB	131
4.2.4.2	Interaktion mit Chlorophyllase?	134
4.2.4.3	Enzyminhibitor-Assays.....	134
4.2.4.3.1	<i>Trypsin</i>	135
4.2.4.3.2	<i>Papain</i>	136
4.2.4.3.3	<i>Myrosinase</i>	137
4.2.4.4	Bindet WSCP Glucose?.....	139
4.2.4.5	Häm-Bindungsversuche.....	142
5	Diskussion.....	143
5.1	Versuche zur biochemischen Charakterisierung von WSCP	143
5.1.1	Der Phytolschwanz ist essentiell für die Stabilität von WSCP-Oligomeren, nicht aber für deren Bildung.....	143
5.1.2	Unpigmentiertes und pigmentiertes WSCP sind leicht unterschiedlich gefaltet	145
5.1.3	Chl <i>a/b</i> -Affinität	148
5.1.4	Energieübertragung zwischen den WSCP-gebundenen Chlorophyllen deutet auf unterschiedliche Chl-Bindungsmodi hin	149

5.1.5	Stabilität und mögliche technische Anwendungen des WSCP.....	151
5.1.6	Rekombinantes WSCP aus <i>Arabidopsis thaliana</i> zeigt ähnliche biochemische Eigenschaften wie rekombinantes BoWSCP, aber auch einige Unterschiede.....	153
5.1.6.1	Rückschlüsse aus den Pigmentbindungseigenschaften von AtWSCP auf den Pigmentbindungsmodus von At- und BoWSCP	155
5.2	Versuche zur biologischen Funktion von WSCP	158
5.2.1	<i>Arabidopsis</i> -WSCP-“knock-out“-Pflanzen zeigen keinen Phänotyp	158
5.2.2	WSCP kann Chlorophylle aus LHCII entfernen.....	160
5.2.3	Enzyminhibitions-Assays.....	164
5.2.4	Überlegungen zur biologischen Funktion von WSCP	167
6	Zusammenfassung	171
	Summary.....	172
7	Literatur	173
8	Anhang.....	182
8.1	Abkürzungen	182
8.2	Proteineigenschaften der verwendeten WSCP-Klone	184
8.3	Nucleotid- und Aminosäuresequenz der verwendeten WSCP-Klone	185
8.3.1	AtWSCP _{his}	185
8.3.2	BoWSCP _{his} und mBoWSCP _{his}	186
8.4	Box-Alignment von Klasse-II-WSCPs	187
8.5	Ergebnisse der DichroWeb-Analysen zur Sekundärstruktur von rekombi- nantem WSCP.....	188
8.6	verwendete Analyseprogramme	188
	Danksagung.....	190
	Erklärung.....	191
	Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 Chlorophyll-bindende Proteine höherer Pflanzen

Die Photosynthese ist die Grundlage für unser Leben auf der Erde. Bei diesem komplexen Prozess wird das Licht der Sonne von photoautotrophen Organismen dazu genutzt, organische Substanz aus anorganischen Ausgangsstoffen wie CO₂, H₂O, Nitrat und Sulfat zu bilden. Dabei entsteht der für uns lebenswichtige molekulare Sauerstoff, der in die Atmosphäre freigesetzt wird (Richter, 1998; Heldt, 2003).

Die Photosynthese ist bei höheren Pflanzen nur möglich aufgrund der hohen Lichtsammeleffizienz von Chlorophyll(Chl)-bindenden Proteinen. In ihnen sind die Chlorophylle in einer definierten Anordnung zueinander ausgerichtet, sodass der Transfer der vom Sonnenlicht stammenden Anregungsenergie auf die photosynthetischen Reaktionszentren optimal funktioniert. Alle Chl-bindenden Proteine höherer Pflanzen, die an der Lichtreaktion der Photosynthese beteiligt sind, sind hydrophobe Proteine, welche in der Thylakoidmembran der Chloroplasten verankert sind. Zusätzlich zu den Chlorophyllen, welche für die Lichtsammlung verantwortlich sind, binden sie alle außerdem Carotinoide, welche vor allem die Funktion haben, die Chlorophylle vor überschüssiger Anregungsenergie zu schützen (Green und Durnford, 1996). Sie können grob unterteilt werden in Chl-bindende Proteine, welche Antennenfunktion besitzen, und diejenigen, die den photosynthetischen Reaktionszentren bzw. „core“-Komplexen angehören, wobei es auch Chl-Protein-Komplexe gibt (z.B. CP43 und CP47), die beide Eigenschaften besitzen. Zusammengefasst werden die Antennenproteine auch als Cab-Familie bezeichnet (für "*chl a/b-binding proteins*").

Zu den Chl-bindenden Proteinen mit Antennenfunktion gehört auch der majore Lichtsammelkomplex des Photosystem (PS) II, der LHCIIb (für "*light-harvesting complex*"). Er wurde im Rahmen dieser Arbeit als potentieller Interaktionspartner des „*water-soluble chlorophyll protein*“ (WSCP, s. 1.2) untersucht. LHCIIb liegt in nativer Form als Trimer vor und bindet pro Monomeruntereinheit 14 Chlorophylle (8 Chl *a* und 6 Chl *b*) sowie vier Carotinoide (2 Luteine, ein Neoxanthin und ein Violaxanthin) (Liu *et al.*, 2004, Standfuss *et al.*, 2005). Die Faltung eines stabilen LHCIIb-Komplexes ist abhängig von – und korreliert mit – der Bindung der Pigmente (Kuttkatt *et al.*, 1997, Heinze *et al.*, 1997; Hooper und Eggink, 1999; Horn und Paulsen, 2002).

Es ist noch unbekannt, wie die photodynamisch aktiven Chlorophylle vor gefährlichen Reaktionen mit Sauerstoff geschützt werden, solange sie nicht von LHCIIb und den anderen Pigment-Protein-Komplexen gebunden und dort von den Carotinoiden geschützt werden. Freie Chlorophylle treten potentiell sowohl bei der Faltung bzw. Assemblierung der Pigment-Protein-Komplexe auf, als auch bei deren Dissoziation, beispielsweise bei Stressbedingungen oder Seneszenzprozessen. LHCIIb, wie auch die anderen an der Photosynthese beteiligten Pigment-Protein-Komplexe, ist in der Thylakoidmembran lokalisiert, während die Enzyme des Chl-Abbaus (z.B. Chlorophyllase) sich in der inneren

Hüllmembran des Chloroplasten befinden (Matile *et al.*, 1999). Die Vermutung liegt also nahe, dass es ein oder mehrere Chl-bindende Proteine geben muss, die nicht membrangebunden, sondern wasserlöslich sind und somit für die Chlorophylle als schützende(s) Transportmolekül(e) zwischen den Chloroplasten-Hüllmembranen und der Thylakoidmembran dienen könnte(n). In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob WSCP (s. 1.2) eine solche Funktion für die Übermittlung von Chlorophyllen von und zu LHCIIb ausüben könnte.

Neben den Antennen- und „core“-Proteinen gibt es noch weitere Chl-bindende Proteine höherer Pflanzen, deren Beteiligung an der Lichtsammlung und Photosynthese höchst unwahrscheinlich ist und deren physiologische Bedeutung bzw. Funktion noch nicht eindeutig aufgeklärt ist. Dazu gehören die sogenannten ELIPs („*early light-induced proteins*“) und SEPs („*stress-enhanced proteins*“), sowie die WSCPs („*water-soluble chlorophyll proteins*“). Auf diese Proteine wird in den Abschnitten 1.1.1 und 1.2 näher eingegangen.

1.1.1 ELIPs und SEPs

In diesem Abschnitt soll auf zwei weitere Gruppen Chl-bindender Proteine höherer Pflanzen etwas näher eingegangen werden, den sogenannten ELIPs und SEPs, die bezüglich der Expressionsbedingungen sowie der postulierten biologischen Funktion Ähnlichkeiten zu dem Forschungsobjekt dieser Arbeit, dem WSCP (s. 1.2), aufweisen .

Bei ELIPs („*early light-induced proteins*“) handelt es sich um Chl-bindende Proteine, welche in der frühen Ergrünungsphase sowie unter Lichtstressbedingungen transient exprimiert werden und dabei in der Membran der Stromathylakoide akkumulieren (Meyer und Klopstech, 1984; Adamska und Klopstech, 1991; Adamska *et al.*, 1992). Sie sind eng verwandt mit der Cab-Familie und besitzen wie der LHCII drei Transmembranhelices (Grimm *et al.*, 1989). Dabei zeigen die Helices I und III eine sehr hohe Sequenzhomologie zu den entsprechenden Helices der Cab-Proteine (Green und Kühlbrandt, 1995).

Biochemische und spektroskopische Untersuchungen an einer aufgereinigten ELIP-Fraktion aus Erbse haben ergeben, dass das Protein Chl *a* und Lutein bindet, in einem Verhältnis von ca. 0,5:1 (Adamska *et al.*, 1999). Es wurde kein Chl *b* gefunden. Die Pigmentbindung scheint bei ELIPs jedoch wesentlich schwächer zu sein als bei den Cab-Proteinen, da die Isolierung und Aufreinigung von ELIPs mit den für die Cab-Proteine verwendeten Standardmethoden nur unpigmentierte ELIPs liefert – nur durch eine schonendere Aufreinigung können pigmentierte ELIPs erhalten werden (Adamska und Klopstech, 1991; Adamska, 1997).

Es gibt unterschiedliche Vorschläge für die biologische Funktion der ELIPs. Am häufigsten wird Ihnen eine photoprotektive Funktion zugeschrieben (Montané und Klopstech, 2000; Hutin *et al.*, 2003; Casazza *et al.*, 2005; Zarter *et al.*, 2006). Weiterhin wird postuliert, dass ELIPs als Pigment-Carrier fungieren in Situationen, in denen freie Chlorophylle entstehen, wie es z.B. bei der Ergrünung sowie bei der Biogenese und/oder dem „*turnover*“ der Chl-bindenden Proteine der Thylakoidmembran der Fall ist (Adamska *et al.*, 1992; Adamska, 1997). Król *et al.* (1994) berichteten, dass ELIPs möglicherweise am Xanthophyllzyklus

beteiligt sind. In jüngster Zeit wurde auch eine Beteiligung der ELIPs an der Regulation der Chl-Synthese postuliert (Tzvetkova-Chevolleau *et al.*, 2007).

Neben ELIPs gibt es noch eine weitere sequenzverwandte Gruppe von stressinduzierten Membranproteinen, die SEPs („*stress-enhanced proteins*“). Auch sie akkumulieren unter Lichtstressbedingungen in der Thylakoidmembran (Heddad und Adamska, 2000). Aus der Analyse ihrer Aminosäuresequenz geht hervor, dass SEPs im Gegensatz zu LHCIIB und ELIPs nur zwei Transmembranhelices enthalten, wobei die erste Helix eine hohe Homologie zur Helix I der Cab-Familie aufweist (Heddad und Adamska, 2000). Die Autoren gehen aufgrund der Aminosäuresequenz davon aus, dass SEPs *in vivo* möglicherweise Homodimere bilden und dabei potentiell zwei Chl-*a*-Moleküle binden können. Ihre biologische Funktion ist noch nicht untersucht worden, es wird jedoch davon ausgegangen, dass SEPs, wie die ELIPs, höchstwahrscheinlich nicht an der Lichtsammlung beteiligt sind (Heddad und Adamska, 2000).

1.2 Wasserlösliche Chlorophyllproteine (WSCPs)

Neben den bislang beschriebenen Chl-bindenden Proteinen, die allesamt hydrophobe, membranständige Proteine sind, gibt es eine weitere Gruppe Chl-bindender Proteine mit ganz anderen biochemischen Eigenschaften. Es handelt sich um hydrophile Proteine, die als WSCPs („*water-soluble chlorophyll proteins*“) bezeichnet werden. Diese Proteine unterscheiden sich nicht nur in ihrer Hydropathie von den anderen Chl-bindenden Proteinen, sondern unter anderem auch in ihrer Stabilität und ihrer Chl-Bindungskapazität. Darüber hinaus unterscheiden sie sich wesentlich von anderen Chl-bindenden Proteinen dadurch, dass sie *keine* Carotinoide binden.

Das erste WSCP wurde 1963 von Yakushiji und Mitarbeitern in Weißem Gänsefuß (*Chenopodium album*) entdeckt. Seitdem wurden vor allem in Brassicaceen weitere WSCPs entdeckt. Anhand ihrer Aminosäuresequenz und ihrer spektroskopischen Eigenschaften kann man WSCPs grundsätzlich in zwei verschiedene Klassen unterteilen, die im Folgenden näher beschrieben werden.

1.2.1 Klasse I

Über WSCPs der Klasse I ist bis heute nur sehr wenig bekannt. Das bereits erwähnte WSCP aus *C. album* gehört dieser Klasse an. Weiterhin wurden diese WSCPs bei den Gattungen *Atriplex*, *Polygonum* und *Amaranthus* gefunden (Takamiya, 1973; Hagar und Hiyama, 1979; Hagar und French, 1983).

Klasse-I-WSCPs unterscheiden sich von den Klasse-II-WSCPs außer in ihrer Aminosäuresequenz vor allem dadurch, dass sie bei Belichtung unter Anwesenheit von molekularem Sauerstoff eine Photokonvertibilität zeigen. Das Absorptionsspektrum des Chl-*a/b*-haltigen Protein-Komplexes erfährt dabei eine erhebliche Rotverschiebung (Oku *et al.*, 1972; Oku und Tomita, 1975; Hagar und Hiyama, 1979; Noguchi *et al.*, 1999). Das ursprünglich bei 668 nm gelegene Rotabsorptionsmaximum liegt nach Belichtung bei 743

nm. Dies ist sowohl bei WSCP aus *C. album* der Fall (Oku *et al.*, 1972, Noguchi *et al.*, 1999), als auch bei WSCP aus *Atriplex rosea* (Hagar und Hiyama, 1979) und *Atriplex hortensis* (Hagar und French, 1983). In Anwesenheit von Reduktionsmitteln kann unter anaeroben Bedingungen die Photokonversion rückgängig gemacht werden, wobei dieser Prozess pH-abhängig ist und höchstwahrscheinlich von der Konformation des Apoproteins gesteuert wird (Oku und Tomita, 1975).

Bei WSCPs der Klasse I handelt es sich um hitzestabile Proteine – Hagar und Hiyama (1979) erhitzen den Proteinextrakt aus *A. rosea* auf 60°C, um das WSCP aufzureinigen, und Oku *et al.* (1972) berichten sogar, dass sie die Proteinlösung gekocht haben, um das WSCP aus *C. album* aufzureinigen.

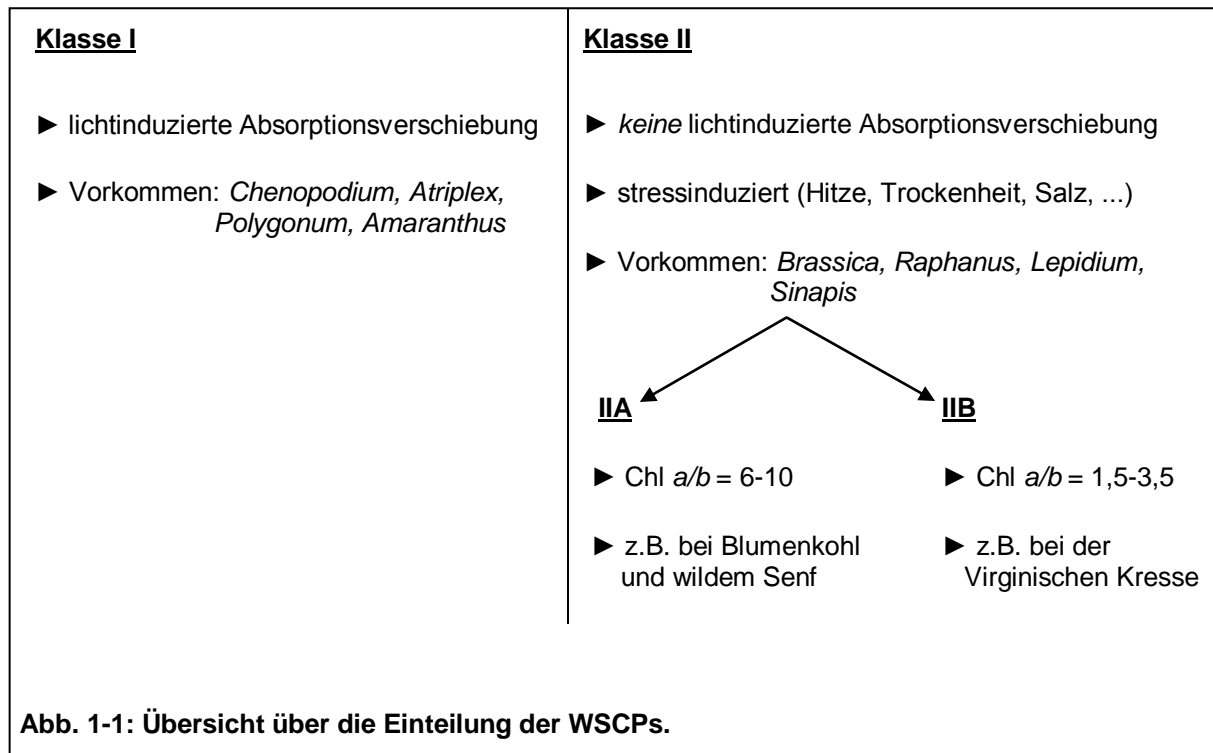
Über die Struktur bzw. Faltung der Klasse-I-WSCPs gibt es keine Literaturangaben. Lediglich die Proteingröße wird mit ca. 69 kDa bei WSCP aus *C. album* bzw. 78 kDa bei WSCP aus *A. rosea* angegeben (Oku und Tomita, 1975; Hagar und Hiyama, 1979). Ohtsuki *et al.* (2007) berichten zwar über die Kristallisation des WSCPs aus *C. album*, ein Strukturmodell liegt jedoch noch nicht vor.

1.2.2 Klasse II

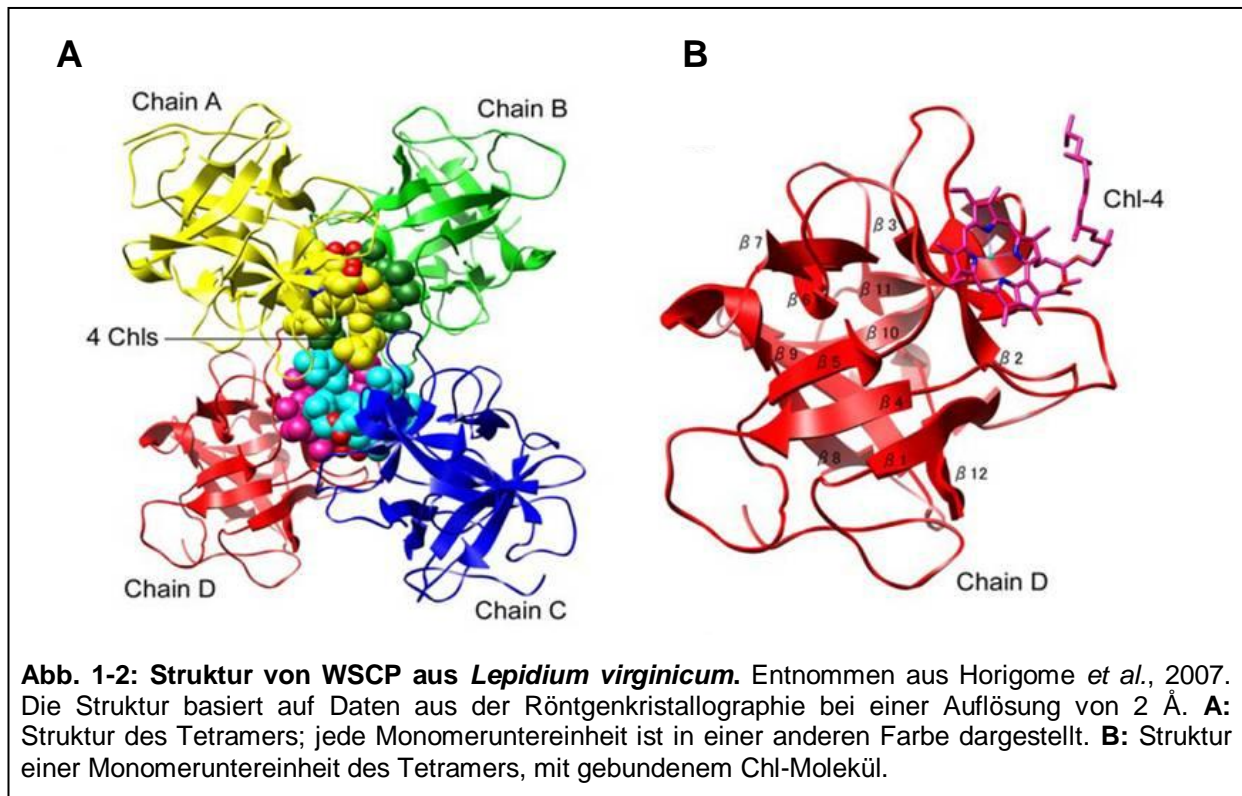
WSCPs der Klasse II sind intensiver erforscht. Sie zeigen im Gegensatz zu den Klasse-I-WSCPs keine Photokonvertibilität und wurden bislang ausschließlich innerhalb der Familie der Brassicaceen gefunden. Ihre Aminosäuresequenzen weisen sehr hohe Übereinstimmungen von meistens über 80% auf – teilweise sogar zu 100%, wie es bei WSCP aus *Brassica oleracea* var. *botrytis* und *Brassica oleracea* var. *capitata* der Fall ist. Ein Alignment der Aminosäuresequenzen verschiedener Klasse-II-WSCPs ist im Anhang unter 8.4 dargestellt.

Bei Klasse-II-WSCPs handelt es sich um Homotetramere mit einer Gesamtgröße von ca. 80 kDa, mit einer Untereinheitengröße von etwa 20 kDa. Pro Tetramer sind 1-4 Chlorophylle gebunden, wobei sowohl Chl *a* als auch Chl *b* gebunden werden kann (Sato *et al.*, 2001). Sato *et al.* (1998) beobachteten, dass die Tetramerisierung des Proteins mit der Chl-Bindung einhergeht. Schmidt *et al.* (2003) postulierten ferner, dass der Phytolschwanz der Chlorophylle für die Tetramerisierung nötig ist, da sie beobachteten, dass Chlorophyllid zwar von WSCP gebunden wurde, das Protein jedoch weiterhin als Monomer vorlag.

Anhand des Chl-*a/b*-Verhältnisses der gebundenen Pigmente kann man die Klasse-II-WSCPs in zwei weitere Gruppen innerhalb dieser Klasse unterteilen: Klasse IIA, mit einem Chl-*a/b*-Verhältnis von 6-10, und Klasse IIB, wo das Chl-*a/b*-Verhältnis mit nur 1,5-3,5 deutlich niedriger liegt. Abb. 1-1 gibt eine Übersicht über die Einteilung der WSCPs.



Kürzlich wurde die Struktur des Klasse-II-B-WSCPs aus *Lepidium virginicum* (Virginische Kresse) bei 2 Å aufgelöst (Horigome *et al.*, 2007). In Abb. 1-2 A sieht man, dass bei diesem WSCP in jeder Monomeruntereinheit ein Chl-Molekül gebunden wird – die Chlorophylle befinden sich dicht gepackt im Zentrum des Tetramers. Abb. 1-2 B zeigt eine Monomeruntereinheit des Proteins. Der hohe β -Sekundärstrukturanteil ist deutlich zu erkennen – insgesamt enthält das Monomer 12 β -Stränge, die eine β -„Kleeblatt“ („*trefoil*“)-Struktur ausbilden. Diese besteht aus einem β -Fass aus sechs Strängen, welches von drei antiparallelen β -Faltblättern bedeckt wird, die aus den restlichen sechs Strängen gebildet werden (Horigome *et al.*, 2007). Das Protein weist insgesamt eine sehr kompakte Faltung auf.



Zu den Besonderheiten der Klasse-II-WSCPs gehört ihre außerordentliche Hitzestabilität (Sato *et al.*, 2001). Wie bereits für Klasse-I-WSCPs erwähnt (s. 1.2.1), wurde dies auch bei der Präparation von Klasse-II-WSCPs ausgenutzt, um eine Aufreinigung des nativen Proteins zu erzielen (Kamimura *et al.*, 1997 und vorliegende Arbeit). Eine weitere Besonderheit dieser Proteine ist ihre Fähigkeit, die gebundenen Chlorophylle in signifikantem Maße vor photooxidativen Schädigungen zu schützen (Schmidt *et al.*, 2003), trotz der Abwesenheit von Carotinoiden. Bei allen anderen Chl-bindenden Proteinen übernehmen Carotinoide diese Aufgabe. Horigome *et al.* (2007) schließen aus den Daten ihrer Strukturanalyse von WSCP aus *L. virginicum*, dass der Grund hierfür höchstwahrscheinlich die kompakte Faltung des Proteins ist. Die hydrophobe Tasche, in der sich die Chlorophylle befinden, ist laut ihrer Daten so eng, dass die Autoren einen Eintritt von Sauerstoff und somit dessen Kontakt mit den Chlorophyllen ausschließen.

Bei rekombinantem WSCP aus Blumenkohl (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) konnte gezeigt werden, dass das Protein außer Chl *a* und *b* noch weitere Chlorophylle (Chl *d*; Hughes *et al.*, 2006) und auch Chl-Derivate (Chlorophyllid, Mg-Protoporphyrin IX, Zn-Pheophorbid, Zn-Pheophytin *a*, Bakteriochlorophyll *a*; Schmidt *et al.*, 2003) binden kann. Zusammen mit der bereits erwähnten Schutzfunktion für die gebundenen Chlorophylle führte diese Beobachtung zu der Hypothese, dass WSCP im Chl-Metabolismus als Transportprotein für Chl und dessen Derivate dient (Schmidt *et al.*, 2003). Auch die Ergebnisse von Sato und Mitarbeitern (1998) unterstützen diese Hypothese. Sie beobachteten, dass rekombinantes Blumenkohl-WSCP Chlorophylle aus der Thylakoidmembran entfernen kann. Die Autoren argumentierten, dass WSCP somit möglicherweise Chl-Moleküle von den Thylakoiden zur Chlorophyllase transportiert. Dieses Enzym des Chl-Abbaus ist – wie bereits in 1.1 erwähnt – nicht in der Thylakoidmembran, sondern in der inneren Chloroplastenhüllmembran lokalisiert

(Matile *et al.*, 1999). Alternativ schlagen Satoh *et al.* (1998) eine Funktion des WSCP als Chl-Carrier während der Reorganisation des Photosyntheseapparates bei Akklimatisationsprozessen vor.

Reinbothe *et al.* (2004a) fanden ein WSCP-Homolog im Stroma von Etiochloroplasten in der monokotylen Gerste (*Hordeum vulgare*), welches während der Ergrünung dort akkumuliert und Chlid bindet. Sie postulierten daher eine Transportfunktion dieses Proteins bei der Chl-Biogenese.

Die mehrfach postulierte Transportfunktion für Chlorophylle (bzw. Chl-Derivate) setzt die Lokalisation des WSCP im Chloroplastenstroma voraus. Bislang gibt es jedoch kaum Literaturquellen zur intrazellulären Lokalisation des Proteins. Neben der eben erwähnten Lokalisation des WSCP-Homologs aus *Hordeum vulgare* im Stroma von Etiochloroplasten (Reinbothe *et al.*, 2004a), findet sich in der Literatur nur *eine* Angabe zur Lokalisation von nativem WSCP in Brassicaceen, die auf direkten Versuchsergebnissen basiert: Murata (1986) entdeckte WSCP bei der Brassicaceae *Lepidium virginicum* in der löslichen Chloroplastenfraktion. Daneben werden für WSCPs verschiedener Brassicaceen-Arten alternative Aufenthaltsorte in der pflanzlichen Zelle in Erwägung gezogen, aufgrund bestimmter Signalsequenzen in ihrer Aminosäureabfolge – eine (transiente) Lokalisation im ER (Satoh *et al.*, 2001; Downing *et al.*, 1992), in der Vakuole (Downing *et al.*, 1992) oder in Microbodies (Lopez *et al.*, 1994).

Neben der Hypothese, dass WSCP als Chl-Carrier dient, gibt es noch eine zweite, weit verbreitete Hypothese zur biologischen Funktion des Proteins. WSCPs der Klasse II weisen N-proximal in ihrer Aminosäuresequenz eine Homologie zu Kunitz-Proteaseinhibitoren auf. Eine postulierte Funktion des WSCP als stressinduzierter Proteaseinhibitor findet man daher am häufigsten in der Literatur (s. hierzu auch Tab. 5-1, Diskussion). Dieser Verdacht liegt nahe, da WSCP bei verschiedenen Brassicaceen in diversen Stresssituationen vermehrt exprimiert wird – beispielsweise durch Trocken- und Salzstress bei *B. napus* und *R. sativus* (Downing *et al.*, 1992; Lopez *et al.*, 1994), durch Blattabszision bei *B. oleracea* var. *botrytis* (Nishio und Satoh, 1997) und durch Hitzestress bei *B. oleracea* var. *capitata* (Annamalai und Yanagihara, 1999). Bisherige Experimente zur proteasehemmenden Wirkung von Klasse-II-WSCPs zeigten jedoch in den meisten Fällen keine bzw. keine signifikante Hemmung der untersuchten Proteasen (Nishio und Satoh, 1997; Kamimura *et al.*, 1997).

Trotz vielfältiger Hinweise auf die physiologische Funktion von Klasse-II-WSCPs konnte bis zum heutigen Zeitpunkt keine der Hypothesen eindeutig bewiesen werden. Die Aufklärung der physiologischen Bedeutung dieses Proteins bleibt also eine spannende Aufgabe.

1.3 Abwehr- und Stressreaktionen von Pflanzen

Da die Expression von Klasse-II-WSCPs vor allem durch Stresssituationen induziert wird (s. 1.2.2), soll dieser Abschnitt einen kurzen Überblick geben über die verschiedenen Reaktionen von Pflanzen auf solche Situationen. Dabei wird hauptsächlich auf diejenige Stressreaktion eingegangen, die auch als Funktion der WSCPs postuliert wird.

Im Gegensatz zu Tieren sind Pflanzen (bis auf wenige Ausnahmen) sessil und können deshalb nicht vor Gefahren flüchten. Zu den Gefahren gehören beispielsweise Stresssituationen, die durch Umweltbedingungen wie starke Hitze- und Lichteinwirkung oder Wassermangel hervorgerufen werden. Weitere Gefahren sind Fraßfeinde und Pathogene. Trotzdem sind Pflanzen diesen Situationen nicht wehrlos ausgeliefert, sondern haben eine Reihe von Schutz- und Abwehrmechanismen entwickelt. Neben den Langzeitanpassungen, die Pflanzen entwickelt haben, um sich ihrer Umgebung anzupassen und/oder Fraßfeinde abzuwehren (z.B. dicke Cuticula, Ausbildung von Stacheln oder Dornen), gibt es eine Reihe von kurzfristig induzierten Schutz- und Abwehrmechanismen. Beispiele hierfür sind programmierter Zelltod bei Pathogenbefall, Produktion von Sekundärmetaboliten, die für Fraßfeinde giftig sind oder deren Feinde anlocken, sowie die Expression von Proteaseinhibitoren bei Pathogenbefall, als Schutz vor Fraßfeinden oder bei klimatischen Stresssituationen. Auf pflanzliche Proteaseinhibitoren wird im Folgenden näher eingegangen, da sich ein Teil dieser Arbeit mit dem Thema beschäftigt.

Die Expression einiger Proteaseinhibitoren wird unter gewissen Bedingungen gezielt induziert, beispielsweise um bestimmte Proteine bei Stress oder Seneszenz vor vorzeitigem Abbau durch endogene Proteasen zu schützen (Desclos *et al.*, 2008), oder auch als Schutz gegen Fremdproteasen von Pathogenen, Mikroorganismen oder Fraßfeinden (Ryan, 1990; Habib und Fazili, 2007). In letzterem Fall besteht die Wirkung vor allem darin, die Aktivität der von den Mikroorganismen sekretierten Proteasen bzw. der im Verdauungstrakt der Fraßfeinde vorkommenden Proteasen zu hemmen und so ihre Nährstoffaufnahme zu erschweren, was einen negativen Effekt auf Wachstum und Entwicklung dieser Organismen hat (Ryan, 1990; Lawrence und Koundal, 2002). Darüber hinaus kommen viele pflanzliche Proteaseinhibitoren natürlicherweise in der Pflanze vor, vor allem in Speicherorganen, und üben dabei eine sehr wichtige Aufgabe als Regulatoren der endogenen Proteaseaktivität aus (Koiwa *et al.*, 1997).

Es sind mindestens neun verschiedene Familien von pflanzlichen Proteaseinhibitoren bekannt (Laskowski und Kato, 1980; De Leo *et al.*, 2002; Mosolov und Valueva, 2005). Davon gehört nur eine Familie (Phytocystatine) der Gruppe der Cysteinproteaseinhibitoren an – die anderen acht gehören zu den Serinproteaseinhibitoren. Koiwa *et al.* (1997) rechnen noch zwei weitere Familien dazu: Inhibitoren von Metalloproteasen und Aspartat-Proteasen.

Die Familie der Kunitz-Proteaseinhibitoren ist am weitesten im Pflanzenreich verbreitet (Mosolov und Valueva, 2005). Sie haben alle ein N-proximales konserviertes Motiv gemeinsam und die meisten haben eine Größe von ca. 20 kDa. Auch WSCPs besitzen diese Eigenschaften und werden daher oft in der Literatur als Proteaseinhibitoren vom Kunitz-Typ eingeordnet (vgl. 1.2.2). Ob WSCPs auch tatsächlich eine hemmende Wirkung auf Proteaseaktivität haben, wird in dieser Arbeit anhand des rekombinanten WSCPs aus Blumenkohl untersucht.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Hauptforschungsobjekt dieser Arbeit ist das rekombinante WSCP aus *Brassica oleracea* var. *botrytis* (Blumenkohl). Ein wichtiger Punkt ist dabei die Optimierung der Expressions- und Rekonstitutionsbedingungen des rekombinanten Proteins, um es in den für die meisten Versuche benötigten großen Mengen zu erhalten.

Neben dieser Methodenoptimierung ist das Ziel des ersten Teils dieser Arbeit die eingehende biochemische Charakterisierung des Proteins, vor allem seine Chl-Bindung und seine Stabilität betreffend. WSCP kann höchstens vier Chlorophylle (*a* oder *b*) pro Tetramer binden, enthält keine weiteren Pigmente und ist rekombinant herstellbar. Aus diesen Gründen eignet sich WSCP hervorragend als Modellprotein, um die Chl-Bindung an Proteine, sowie Chl-Chl- und Chl-Protein-Wechselwirkungen zu erforschen. Im Rahmen einer Forschungskoooperation mit dem Institut für Optik und Atomare Physik (IOAP) der TU Berlin sollen diese Eigenschaften am rekombinanten Blumenkohl-WSCP untersucht werden. Bezüglich der Chl-Bindung stellt sich vor allem die Frage, ob die WSCP-gebundenen Chlorophylle excitonisch miteinander gekoppelt sind und somit Anregungsenergie aufeinander übertragen und weiterleiten können, was in Kombination mit der Stabilität des WSCP-Pigment-Komplexes von technischem Nutzen sein könnte.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der biologischen Funktion der Klasse-II-WSCPs, wobei das Augenmerk auf das WSCP aus Blumenkohl und aus *Arabidopsis thaliana*, welche wie Blumenkohl der Familie der Brassicaceen angehört, gerichtet ist. Dazu sollen unter anderem homozygote WSCP-„knock-out“-Mutanten von *Arabidopsis thaliana* hergestellt werden, um sie anschließend eingehend zu untersuchen. Die physiologischen Versuche, die mit diesen Pflanzen – und als Vergleich auch mit Wildtyppflanzen – durchgeführt werden, haben das Ziel, einen Phänotyp der Mutanten zu entdecken, der einen Anhaltspunkt für die Funktion des Proteins liefern könnte. Des Weiteren soll in den Wildtyppflanzen die Lokalisation des Proteins näher erforscht werden.

Die Expression vieler Klasse-II-WSCPs ist stressinduziert (vgl. 1.2.2) und sie besitzen typische Merkmale von Kunitz-Proteaseinhibitoren (s. 1.3). In Anbetracht dieser Eigenschaften ist auch eines der Ziele des zweiten Teils dieser Arbeit, das WSCP aus Blumenkohl auf mögliche proteasehemmende Eigenschaften zu untersuchen. Dabei sollen *in vitro* Versuche mit dem rekombinanten Protein durchgeführt werden, die an erste vielversprechende Ergebnisse von Gundlach, 2006 (Diplomarbeit), anknüpfen.

2 Material

2.1 Geräte

Analytische HPLC:	Jasco Labor- u. Datentechnik GmbH (Groß-Umstadt)
<i>Entgaser</i>	GASTORR 154; Jasco
<i>Gradientenmischer</i>	LG-1580-04
<i>Pumpe</i>	PU-1580
<i>Detektor</i>	Diode Array Detector MD-1515
<i>Säule</i>	Chromolith Speed-Rod, RP 18E, Nr. 1.51450.0001 l = 50 mm; d = 4,6 mm, Merck (Darmstadt)
<i>Software</i>	Borwin-PDA, Version 1.50
Autoklav:	
Varioklav Typ 500	Dampfsterilisator, H+P Labortechnik GmbH (München)
CD-Spektrometer:	
Jasco J-810-S	Jasco Labor- u. Datentechnik GmbH (Groß-Umstadt)
<i>Peltier-Element</i>	Modell CDF-426S/426L
<i>Software</i>	Spectra Manager, Version 1.6
Digitalkamera:	
Canon Powershot A710IS	Canon Deutschland GmbH (Krefeld)
Olympus CAMEDIA C-3040 Zoom	Olympus Deutschland GmbH (Hamburg)
Fluoreszenzspektrometer:	
FluoroMax-2	Jobin Yvon GmbH (Grasbrunn)
<i>Software</i>	Datamax Software, Version 2.24
Magnetrührer:	
Heidolph MR 3001 K8	Heidolph Elektro (Kelheim)
Ikamag RCT	IKA Labortechnik (Staufen)
Mixer:	
Heavy Duty Blender	Blender Waring (Torrington, CT, USA)
PCR-Cycler:	
Primus 25 Legal PCR System, Modell 5524	MWG-Biotech (Ewersberg)
pH-Meter:	
InoLab pH Level2	WTW GmbH (Weilheim)
Photometer:	
UV-2101PC	Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan)
V-550	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH (Groß-Umstadt)

Präparative HPLC:

<i>Pumpen</i>	Modell 510, 501; Waters Millipore (Milford, MA, USA)
<i>Interface</i>	System Interface Module; Waters Millipore (Milford, MA, USA)
<i>Detektoren</i>	
<i>Absorption</i>	SP-6V; Gynkotec GmbH (Germering)
<i>Fluoreszenz</i>	RF 535; Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan)
<i>Säule</i>	Waters Bondapak C18; 125 Å; 10 µm; 30x300 mm
<i>Software</i>	Max 820; Waters

Protein-Gelelektrophorese:

<i>Gel-Gießapparatur</i>	Midget-Systems, Pharmacia LKB (Uppsala, Schweden)
<i>Spannungsquelle</i>	Bio-Rad Power Pac 3000 (Hercules, CA, USA)
<i>Kühlung</i>	Haake GH, Haake D1
<i>Geltrockner</i>	2003 Slab Gel Dryer; LKB Bromma

Quantenmessgerät:

Quantum/Radiometer/Photometer Modell LI-250 Light Meter	LI-COR, Lincoln, NE, USA
--	--------------------------

Reinstwasseranlage:

Optilab-Standard	MembraPure (Lörzweiler)
------------------	-------------------------

Rotationsverdampfer:

Heidolph VV 2000	Heidolph Elektro (Kelheim)
------------------	----------------------------

Schüttler:

Certomat H (<i>für Bakterienkulturen</i>)	B.Braun Biotech International (Melsungen)
Phero-Shaker (<i>für Gele</i>)	Biotec-Fischer (Reiskirchen)

SpeedVac:

Vacuum Concentrator Mini-30	Bachhofer GmbH (Reutlingen)
-----------------------------	-----------------------------

Sterilbank:

Laminar Flow	SLEE Semiconductor Technik GmbH (Mainz)
--------------	---

Transilluminator:

VersaDoc Imaging System, Modell 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
<i>Software</i>	Quantity One, Version 4.6.3 Basic

Ultraschallbad:

Sonorex Super RK102H	Bandelin (Berlin)
----------------------	-------------------

UV-Lampe:

SFB 184	Bachhofer GmbH (Reutlingen)
---------	-----------------------------

Vortexer:

MS2 Minishaker	IKA Labortechnik (Staufen)
----------------	----------------------------

Waagen: <i>Präzisionswaagen</i> <i>Analysenwaage</i>	Sartorius AG (Göttingen) BP 2100 S; L 610 A 200 S
Wärmeschrank: S12	Memmert (Schwalbach)
Wasserbad: Thermomix MM	B. Braun Biotech International (Melsungen)
Wasserkocher: HB4 Basic	IKA Labortechnik (Staufen)
Zellaufschluss-Press: French Pressure Cell Press	SLM Aminco Instruments, Inc. (Rochester, N.Y., USA)
Zentrifugen:	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen); Beckmann Instruments (München)
<i>Tischzentrifuge</i>	Hettich Mikro 22 (Rotor: 1195-L)
<i>Kühlzentrifugen</i>	Beckmann Kühlzentrifuge J2HS (Rotoren: JLA-10500; JA20) Hettich Universal 30RF (Rotoren: 1414 und 1412) Hettich Mikro 22R (Rotoren: 1015, 1016 und 1195)
<i>Ultrazentrifugen</i>	Beckmann Optima CO-XL -100K Beckmann Optima LE-80K (Rotoren: SW 40Ti, SW 41Ti)

2.2 Chemikalien

Aceton wurde vor Gebrauch zweimal destilliert, um Verunreinigungen zu entfernen. Beim Diethylether mussten vor Gebrauch möglich enthaltene Peroxide beseitigt werden. Dazu wurde der Ether mit KOH-Plätzchen versetzt und zwei Stunden unter Rückfluss aufgeköcht und anschließend abdestilliert.

Alle weiteren Chemikalien wurden p.a. eingesetzt, soweit nicht anders vermerkt.

Zum Eintrocknen der Pigmente wurde Stickstoff 5.0 der Firma Messer-Griesheim verwendet.

2.3 Pigmente

Pigmenttotalextrakt (Chlorophylle + Carotinoide)	Aus Erbsen isoliert (s. 3.1.1.2)
Chlorophyll <i>a</i> und Chlorophyll <i>b</i>	Aus Erbsen isoliert (s. 3.1.1.4)
Chlorophyllid <i>a</i> und Chlorophyllid <i>b</i>	Aus Chl <i>a</i> und <i>b</i> hergestellt (s. 3.1.2.1)
Pheophytin und Pheophorbid <i>a</i> und <i>b</i>	Aus Chl <i>a</i> und <i>b</i> hergestellt (s. 3.1.2.2)

2.4 Organismen

Bakterien: *Escherichia coli*, Wirtsstämme JM 101 und Rosetta(DE3)

Erbse: *Pisum sativum* L.cv.Golf

Arabidopsis thaliana: Wildtyp (Col-0 Ecotyp);

tDNA-Insertionsmutante SALK_009681; „knock-out“ des Gens At1g72290 (WSCP), bezogen von Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC)

2.5 Proteinlängenmarker

Tab. 2-1: SDS-7-Marker (Sigma, Deisenhofen)

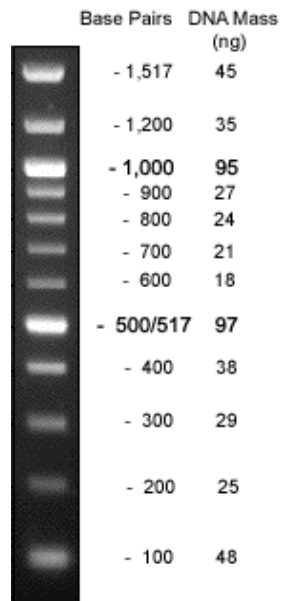
Größe (kDa)	Protein
66	Albumin (Bovine)
45	Albumin (Egg)
36	Glycerinaldehyd-3-P Dehydrogenase
29	Carboanhydrase
24	Trypsinogen
20	Trypsin-Inhibitor
14	Lactalbumin

gelöst in 62,5 mM Tris/HCl pH 6,8; 2% SDS; 5% β -Mercaptoethanol; 10%Glycerin; 0,001% Bromphenolblau.

2.6 Basenpaarstandards

Die verwendeten Basenpaarstandards wurden von New England Biolabs (NEB, Schwalbach) bezogen.

100 bp-Ladder (0,5 µg Gelauftrag)



1 kb-Ladder (0,5 µg Gelauftrag)

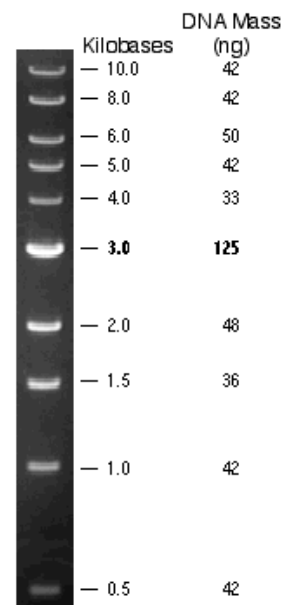


Abb. 2-1: In dieser Arbeit verwendete Basenpaarstandards für die Auftrennung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese.

3 Methoden

3.1 Biochemische Methoden

3.1.1 Isolierung von Chlorophyll aus Erbsenblättern

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Pigmente wurden aus Erbsenpflanzen isoliert und aufgereinigt. Die Erbsenpflanzen wurden selbst angezogen.

3.1.1.1 Anzucht der Erbsen

Nach einer 24-stündigen Quellung werden die Erbsen in Vermiculit ausgesät und danach im Klimaraum (bei 16 Stunden Beleuchtung und 20°C Raumtemperatur) ca. 14 Tage lang angezogen. Danach erfolgt das Ernten der Erbsenblätter und die Herstellung eines Totalextraktes.

3.1.1.2 Extraktion der Pigmente (Totalextrakt)

Da die Pigmente lichtempfindlich sind werden alle Arbeiten mit Pigmentlösungen möglichst dunkel durchgeführt. Zudem werden alle Arbeiten auf Eis und möglichst rasch durchgeführt, da sich der Pigmentabbau bei Temperaturen > 0°C und durch Reaktion mit Luftsauerstoff beschleunigt.

Material:

Pisum sativum Pflanzen (ca. 14 Tage alt)
Aufschlusspuffer [25 mM Tris (pH 7,0); 1 mM 1,4-Dithiotreitol (DTT); 330 mM Sorbitol]
100% Aceton

Mit einer Schere werden die oberen Blätter der ca. 14 Tage alten Pflanzen geerntet und grob zerkleinert. Nach Zugabe von etwa 2 Litern Aufschlusspuffer werden die Blätter im Waring Blender zerkleinert (ca. 10 Impulse à 10 s). Das entstandene Homogenat wird durch 3 Lagen Baumwollgaze in 500 ml Zentrifugenbecher abfiltriert und danach 3 Minuten zentrifugiert (4°C, 8000 UpM, Rotor JLA-10500, Beckmann Kühlzentrifuge). Der abgetrennte Überstand wird verworfen und das Pellet in insgesamt 500 ml Aceton resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wird der acetonische Überstand (Totalextrakt) in einem Becherglas auf Eis gesammelt und dunkel gelagert.

Es folgt die Dioxanfällung zur Trennung von Chlorophyllen und Xanthophyllen.

3.1.1.3 Trennung von Chlorophyllen und Xanthophyllen mit 1,4-Dioxan

Material:

1,4-Dioxan
Totalextrakt (s. 3.1.1.2)
dH₂O
Diethylether (frisch destilliert!)
5 M NaCl

In den zuvor hergestellten Totalextrakt (500 ml) werden (unter ständigem Rühren und Kühlung auf Eis) mit einem Tropftrichter 0,15 Volumen (75 ml) 1,4-Dioxan langsam zugegeben und anschließend noch 0,32 Volumen (160 ml) dH₂O. Die letzten 60 ml Wasser werden sehr langsam zugetropft. Anschließend wird der Rührer ausgeschaltet und die Fällmischung eine Stunde auf Eis stehen gelassen. Die ausgefällten Chlorophylle werden danach 10 Minuten bei 4°C und 10.000 UpM (Rotor: JLA-10500, Beckmann) abzentrifugiert.

Das Chlorophyllpellet wird in einem Schütteltrichter mit Diethylether aufgenommen und mehrmals unter vorsichtigem Schwenken mit Wasser gewaschen („ausgeschüttelt“). Zur besseren Phasentrennung wird 5 M Salzlösung (NaCl) zugegeben. Danach wird die Etherphase abgenommen und im Rotationsverdampfer einrotiert.

Der gelbliche Überstand mit den Xanthophyllen wird ebenfalls in Diethylether aufgenommen und anschließend mehrmals mit Wasser gewaschen. Auch hier erfolgt die Zugabe von Salzlösung zur besseren Phasentrennung und Vermeidung der Emulsionsbildung. Es wird nur soviel Salzlösung zugegeben, dass die wässrige Phase gerade nicht mehr gelb gefärbt ist. Anschließend folgt auch hier das Einrotieren der Etherphase.

Zur Lagerung der Kolben mit dem isolierten, getrockneten Pigment werden diese mit Stickstoff überschichtet.

3.1.1.4 Präparative HPLC zur Auftrennung von Chl *a* und Chl *b*

Zur Trennung von Chlorophyll *a* und *b* und zur Abtrennung von Chlorophyllderivaten, wie z.B. Hydroxy- und phäophytinisiertem Chlorophyll, sowie von restlichem Xanthophyll, wird ein präparatives HPLC-System verwendet. Hierbei wird ein C18-Material als stationäre Phase eingesetzt und ein Aceton/Wasser-Gradient als mobile Phase. Dadurch wird es möglich, die Chlorophylle aufgrund ihrer unterschiedlichen Hydrophobizität aufzutrennen.

Material:

100% Aceton (filtriert und entgast)
86% Aceton (filtriert und entgast)
Wasser reinst (entgast und mit 0,1 mM TrisHCl, pH 7, gepuffert)
eingetrocknete Chlorophylle unter Stickstoff
Diethylether

Detektoreneinstellungen: SP-6V:

Absorption: 0,04
Response: Standard

Shimadzu RF 535:

Excitation: 435 nm
Emission: 680 nm
Response: medium
Range: 2
Sensitivity: high

Programm: „CHLMOD“; Dauer: 360 min.

Programmierter Gradient (Fluss: 5 ml/min.):

A [%]	B [%]	t [min]	Δt [min]
86	14	0	0
86	14	100	100
88	12	270	170
100	0	320	50

Zunächst erfolgt eine Äquilibration auf den Startgradient von 86/14. Erst jetzt kann eine Probe zur Trennung aufgetragen werden. Zum Protokoll der Inbetriebnahme des HPLC-Systems siehe Bedienungsanleitung.

Die eingetrockneten und unter Stickstoff gelagerten Chlorophylle werden in 86 ml 100% Aceton aufgenommen, im Ultraschallbad homogenisiert und anschließend mit 14 ml gefiltertem und entgastem Reinstwasser (gepuffert mit 0,2 mM Tris/HCl pH 7) auf 86 % Acetongehalt eingestellt. Es folgt ein 8-minütiges Abzentrifugieren von wieder ausgefallenem Chlorophyll (Löslichkeitsprodukt in 86% Aceton niedriger als in 100% Aceton) bei RT und 10.000 UpM (Rotor: JA20, Beckmann). Der Überstand wird rasch abgegossen und in zwei 50 ml Portionen in eine spezielle Probenauftragschleife (Super-Loop) eingefüllt. Anschließend erfolgt der Auftrag des Probenmaterials auf die Trennsäule.

Nachdem beide Loop-Füllungen auf die Säule aufgetragen wurden, wird das Programm „CHLMOD“ gestartet und die Trennung vorgenommen. Nach ca. 1,1 Stunden kann eine Chlorophyll-*b*-Fraktion aufgefangen werden, kurz darauf (nach ca. 1,5 Stunden) folgt die Chlorophyll-*a*-Fraktion. Die getrennten Chlorophylle werden anschließend jeweils in Diethylether überführt und mehrmals mit Wasser gewaschen. Nach erfolgter Phasentrennung wird die Etherphase mit dem Chlorophyll im Rotationsverdampfer eingetrocknet und anschließend in einem definierten Volumen 100 % Aceton wieder aufgenommen.

Es folgt die Qualitätsprüfung und gleichzeitig die Konzentrationsbestimmung mit der analytischen HPLC (s. Punkt 3.1.3.1). Nach der Quantifizierung werden die Chlorophylle aliquotiert und schließlich unter N₂ eingetrocknet und bei -20°C gelagert.

3.1.2 Herstellung von Chlorophyllderivaten

3.1.2.1 Herstellung von Chlorophyllid aus Chlorophyll

Das in dieser Arbeit verwendete Chlorophyllid wurde aus reinem Chl *a* bzw. Chl *b* (Gewinnung s. 3.1.1) mit Hilfe des Enzyms Chlorophyllase hergestellt. In der Pflanze ist Chlorophyllase am Chl-Abbau beteiligt, indem es die Abspaltung des Phytolschwanzes katalysiert (Hörtensteiner, 2006).

Material:

Chlorophyllase-Extrakt aus Roggenkeimlingen (s. Lion, 2005 (Dissertation))
50 mM TrisHCl pH 8
Aceton:0,1 M NH₄OH (9:1)
1 M KH₂PO₄
100% Aceton p.a.
Hexan p.a.
Diethylether (peroxidfrei)

Zunächst wird ein Chlorophyllase-haltiges Pulver aus etiolierten Roggenkeimlingen hergestellt wie in Lion, 2005 (Dissertation), beschrieben. Von diesem Pulver werden ca. 9 TL in 50 ml 50 mM TrisHCl pH 8 gelöst. 30 mg Chl (*a* bzw. *b*) werden in 50 ml 100% Aceton vollständig gelöst (Ultraschall) und anschließend mit der Chlorophyllase-Lösung vermischt. Der Reaktionsansatz wird in einer mit Alufolie umwickelten Flasche (Lichtschutz!) ca. 2 Stunden bei 32°C und 150 UpM auf einem Schüttler inkubiert. Die Vollständigkeit der Reaktion wird in regelmäßigen Abständen während der Inkubation überprüft. Dazu werden 100 µl des Reaktionsansatzes entnommen und in einem Reaktionsgefäß mit 100 µl Aceton:0,1 M NH₄OH (9:1) sowie 100 µl Hexan versetzt. Diese Mischung wird einige Male invertiert, wonach sich eine Phasentrennung zeigt. Noch nicht umgesetztes Chlorophyll ist in der oberen Hexanphase gelöst, Chlorophyllid befindet sich in der unteren wässrigen Acetonphase. Sobald die Hexanphase farblos erscheint ist die Umsetzung von Chlorophyll zu Chlorophyllid vollständig und die Chlorophyllasereaktion wird durch Zugabe von 150 ml 100% Aceton abgebrochen.

Der Reaktionsansatz wird zur Entfernung des Chlorophyllasepulvers durch einen Papierfilter filtriert und die filtrierte acetonische Pigmentlösung in einen Scheidetrichter gefüllt. Um mögliche Chlorophyllreste zu entfernen wird die Acetonphase im Scheidetrichter mit je 50 ml Hexan gewaschen, bis die Hexanphase farblos ist (ca. 5x), und die chlorophyllhaltige Hexanphase jeweils verworfen. Die chlorophyllidhaltige, gewaschene Acetonphase wird nun mit 1 M KH₂PO₄ auf pH 5,9 gebracht, mit ca. 100 ml Diethylether überschichtet und durch vorsichtiges Ausschütteln (vgl. 3.1.1.3) das Chlorophyllid in die Etherphase überführt. Die acetonische Phase wird abgelassen und verworfen und die Etherphase mehrmals vorsichtig mit KH₂PO₄-haltigem dH₂O gewaschen, wobei die wässrige Phase jeweils abgetrennt und verworfen wird. Der Ether wird schließlich im Rotationsverdampfer entfernt.

Das eingetrocknete Chlorophyllid wird in 5 ml 100% Aceton p.a. vollständig gelöst, quantifiziert (s. 3.1.3.2), aliquotiert und schließlich unter N₂ eingetrocknet und bei -20°C gelagert.

3.1.2.2 Herstellung von Pheophytin und Pheophorbid aus Chlorophyll

Pheophytin sowie Pheophorbid wurden in dieser Arbeit aus einer reinen Chl-*a/b*-Mischung mit einem Chl-*a/b*-Verhältnis von ca. 1,2 hergestellt (Gewinnung von reinem Chl *a* bzw. Chl *b* s. 3.1.1).

Material:

Chlorophyll
Diethylether (peroxidfrei)
10% (v/v) HCl
dH₂O
Trifluoressigsäure (TFA)

Das Chlorophyll wird in 2 ml Diethylther pro mg Chl gelöst, anschließend das gleiche Volumen 10%ige HCl dazugegeben und alles in einem Scheidetricher vorsichtig ausgeschüttelt. Durch die Salzsäure wird das zentrale Magnesium-Ion aus dem Porphyrinringsystem des Chlorophylls verdrängt, wodurch das Pigment Pheophytin entsteht. Schließlich wird die Etherphase dreimal mit dH₂O gewaschen und die wässrige Phase jeweils verworfen. Die Pheophytin enthaltende Etherphase wird in einem Rundkolben bei -20°C über Nacht gelagert, um restliches Wasser auszufrieren.

Die Pheophorbidherstellung erfolgt durch saure Hydrolyse. Dafür wird das Chl in 1 ml Trifluoressigsäure (TFA) pro mg Chl gelöst und 15 Min. bei Raumtemperatur und unter N₂-Fluss gerührt. Daraufhin wird die Lösung in einen Scheidetricher umgefüllt, mit Diethylether überschichtet und vorsichtig ausgeschüttelt. Die pheophorbidhaltige Etherphase wird mehrmals mit dH₂O gewaschen und die wässrige Phase jeweils verworfen. Um die Polarität der wässrigen Phase zu erhöhen kann etwas 5 M NaCl zugegeben werden. Die Pigmentlösung wird im Rundkolben bei -20°C über Nacht gelagert, um restliches Wasser auszufrieren.

Das Wasser wird dann rasch unter Verwendung einer Vakuumpumpe, Filterpapier und gekühlten Fritten abfiltriert. Die Pigmentlösung wird unter Vakuum im Rotationsverdampfer eingetrocknet und in mit Stickstoff gesättigter Atmosphäre im Rundkolben bei -20°C gelagert.

Das eingetrocknete Pheophytin bzw. Pheophorbid wird in 5 ml 100% Aceton p.a. vollständig gelöst, quantifiziert (s. 3.1.3.2), aliquotiert und schließlich unter N₂ eingetrocknet und bei -20°C gelagert.

3.1.3 Pigmentquantifizierung

3.1.3.1 Pigmentquantifizierung und -qualitätsanalyse mittels analytischer HPLC

Durch die HPLC-Analyse erhält man eine recht genaue Aussage bezüglich Qualität und Quantität von Pigmenten. Die Funktionsweise der analytischen HPLC entspricht derjenigen der präparativen HPLC (s. 3.1.1.4), allerdings ist hier das Probenvolumen deutlich geringer (20 µl). Wie auch bei der präparativen HPLC macht man sich hier die unterschiedliche Löslichkeit der einzelnen Pigmente zunutze, um diese nacheinander durch einen geeigneten Acetongradienten von der HPLC-Säule zu eluieren.

Material:

100% Aceton (filtriert und entgast)

Wasser reinst. (entgast und mit 0,2 mM Hepes oder Tris/HCl pH 7,0 gepuffert)

Pigmentextrakte in 80% Aceton

Zur Untersuchung wird ein kleines Aliquot getrockneten Pigments in einem definierten Volumen 80% Aceton aufgenommen, wobei die Menge an Aceton so gewählt wird, dass die resultierende Lösung nur noch schwach gefärbt ist.

Nach jeder neuen Inbetriebnahme oder längeren Messpause (> 1 Stunde) muss die Säule vor dem Probenauftrag äquilibriert werden. Das geschieht, indem mindestens zwei Leerläufe gemacht werden, d.h. anstelle einer Probe wird nur 80% Aceton auf die Säule aufgetragen und das HPLC-Programm gestartet.

Vor jedem Probenauftrag wird die verwendete Hamilton-Spritze mehrmals mit 100% Aceton gespült. Danach folgt das Spülen der Probenauftragsschleife, entweder 3x mit der Probe selbst (wenn genug Probenvolumen zur Verfügung steht) oder mit je 3x 100% Aceton. Erst danach wird die eigentliche Probe luftblasenfrei in die Spritze aufgezogen und in die Probenauftragsschleife (20 µl Fassungsvermögen) eingespritzt. Durch Umlegen des Hebels von „Load“ auf „Inject“ wird die Probe auf die Säule aufgetragen und automatisch das HPLC-Programm gestartet:

Programm: „ChromolithA“; Dauer: 6,5 min.

Programmierter Gradient (Fluss: 1 ml/min.):

A [%]	B [%]	t [min]	Δt [min]
70	30	0	0
100	0	3	3
100	0	3,5	0,5
70	30	4	0,5
70	30	6,5	2,5

Mit Hilfe der Computersoftware „Borwin PDA“ lässt sich auf dem Monitor das Elutionsprofil darstellen. Durch Integrieren kann die Fläche der Peaks ermittelt werden, woraus sich wiederum die Menge der in der Probe enthaltenen Pigmente errechnet lässt. Hierzu werden von der Software folgende Umrechnungsfaktoren verwendet, die von Dr. S. Hobe (Universität Mainz) durch Erstellen einer Eichgerade mit Pigmentlösungen bekannter Konzentration ermittelt wurden:

Tab. 3-1: Umrechnungsfaktoren für die Pigmentquantifizierung mittels analytischer HPLC
(Stand: 01.07.03)

Pigment	Umrechnungsfaktor
Neoxanthin	$1,227 \cdot 10^{-4}$
Violaxanthin	$1,002 \cdot 10^{-4}$
Lutein	$1,154 \cdot 10^{-4}$
Chlorophyll <i>b</i>	$3,855 \cdot 10^{-4}$
Chlorophyll <i>a</i>	$5,593 \cdot 10^{-4}$

3.1.3.2 Photometrische Quantifizierung

Die in dieser Arbeit verwendeten Chl-Derivate – Chlorophyllid, Pheophytin und Pheophorbid – konnten nicht mittels analytischer HPLC quantifiziert werden, da einerseits keine Eichgerade für die Quantifizierung vorhanden war und andererseits das Elutionsprofil der HPLC nicht für die polaren Pigmente Chlorophyllid und Pheophorbid geeignet war. Die Quantifizierung dieser Pigmente erfolgte demnach photometrisch mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

(E = Extinktion; ε = molarer Extinktionskoeffizient, s. Tab. 3-2; c = Konzentration in mg/ml; d = Schichtdicke der Küvette in cm)

Für die Messung wird eine Verdünnung des Pigments in 80% Aceton angesetzt. Gemessen wird die Extinktion im Rotabsorptionsmaximum des jeweiligen Pigments. Um die Lage des Maximums zu überprüfen, wird jeweils ein Absorptionsspektrum aufgenommen, wie in 3.1.15.1.1 beschrieben. Über die entsprechenden Molekulargewichte der Pigmente (s. Tab. 3-2) können schließlich die Konzentrationen in mg/ml berechnet werden.

Tab. 3-2: Parameter zur photometrischen Quantifizierung der Chlorophyllderivate. Da der Phytolschwanz nicht zur Rotabsorption beiträgt, gelten für Chlorophyllid dieselben λ - und ϵ -Werte wie für Chlorophyll, und für Pheophorbid dieselben Werte wie für Pheophytin. Die Werte gelten für Pigmente in 80% Aceton, entnommen aus Köst *et al.*, 1988 (CRC Handbook of Chromatography: Plant Pigments).

Pigment	Rotabsorptionsmaximum (λ , in nm)	Molarer Extinktionskoeffizient (ϵ , in $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$)	Molekulargewicht (Da)
Chlorophyllid <i>a</i>	665	81.000	615,0
Chlorophyllid <i>b</i>	649	47.600	629,0
Pheophytin <i>a</i>	667	49.200	871,2
Pheophytin <i>b</i>	655	81.600	885,2
Pheophorbid <i>a</i>	667	49.200	592,7
Pheophorbid <i>b</i>	655	81.600	606,7

3.1.4 Isolierung von nativem WSCP aus Blumenkohlblättern

Die Isolierung von nativem WSCP aus Blumenkohlblättern erfolgte in Anlehnung an Schmidt 2003 (Dissertation), mit einigen Änderungen. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Arbeitsschritte bei Raumtemperatur (RT) ausgeführt.

Material

Blumenkohlblätter (ca. 500 g, ohne Mittelrippe)
 Homogenisierungspuffer [100 mM NaP pH 7,4; 850 mM NaCl; 26 mM Ascorbat; 3 g PVP (25.000 g/mol)]
 NaP pH 7,4 (5, 10, 20, 50 und 100 mM)
 10 mM NaP pH 7,8
 detergensfreier Laufpuffer [25 mM Tris; 192 mM Glycin]
 Ammoniumsulfat (AMS)
 8% PAA-Gele (s. 3.1.12)
 Anionenaustauschersäule (Fractogel[®] EMD DEAE (M), Partikelgröße 40-90 μm ; Merck)
 Gelfiltrationssäule (Sephacryl S-200 HR; Amersham Biosciences)
 Ultrafiltrationseinheiten, 30 kDa MWCO (Amicon Ultra-4 Filter, Millipore)

Die Blumenkohlblätter werden in 500 ml Homogenisierungspuffer im Waring Blender homogenisiert und durch vier Lagen Mull filtriert. Zur Proteinfällung wird das Filtrat sehr langsam (!) unter Rühren mit 212 mg festem AMS pro ml Filtrat versetzt, sodass schließlich eine AMS-Sättigung von 40% (w/v) erreicht wird. Die Lösung wird 10 Min. unter Rühren inkubiert und anschließend abzentrifugiert (15 Min., RT, 27200 x g). Das Pellet wird verworfen; der Überstand wird zur weiteren Proteinfällung mit 159 mg AMS pro ml Lösung wie oben beschrieben versetzt, sodass die AMS-Sättigung auf 70% (w/v) erhöht wird. Es wird wieder inkubiert und zentrifugiert wie oben beschrieben. Diesmal wird der Überstand verworfen; das Pellet wird in einem möglichst geringen Volumen (~ 10 ml) 5 mM NaP pH 7,4 solubilisiert. Verbleibende unlösliche Bestandteile werden abzentrifugiert wie oben beschrieben. Da WSCP äußerst hitzestabil ist, wird der Überstand 3 Min. bei 100°C im

Wasserbad gekocht, um Verunreinigungen durch andere Proteine weitestgehend zu entfernen. Die denaturierten Proteine werden anschließend abzentrifugiert (s.o.) und der Überstand (sollte grün und klar sein) über Nacht gegen 5 Liter 5 mM NaP pH 7,4 bei Raumtemperatur dialysiert. Gelegentlich kommt es vor, dass der Überstand braun ist, was vermutlich auf Verunreinigungen durch Polyphenole zurückzuführen ist. Diese werden jedoch in der weiteren Aufreinigung entfernt.

Das Dialysat wird wieder abzentrifugiert (s.o.) und der Überstand nun über eine Anionenaustauschersäule (6 ml Säulenvolumen, Fractogel[®] EMD DEAE (M), Partikelgröße 40-90 µm; Merck), die zuvor mit 5 mM NaP pH 7,4 äquilibriert wurde, weiter aufgereinigt. WSCP adsorbiert an die DEAE-Säule und wird durch sukzessive Erhöhung der Salzkonzentration aufgereinigt und schließlich eluiert. Dazu wird die Säule nach dem Probenauftrag mit je zwei Säulenvolumina 5, 10 und 20 mM NaP pH 7,4 gewaschen. Es folgt noch ein Waschschrift mit *einem* Säulenvolumen 50 mM NaP pH 7,4 – WSCP fängt hierbei bereits an, sich von der Säule zu lösen. Schließlich wird das verbleibende Protein mit 100 mM NaP pH 7,4 von der Säule gelöst und das grüne Eluat wird aufgefangen. Das DEAE-Säulenmaterial kann regeneriert und wiederverwendet werden (s.u.).

Zur weiteren Aufreinigung der WSCP-Probe wird nun eine präparative native PAGE durchgeführt (s. 3.1.12.2). Vorher muss das grüne Eluat der DEAE-Säule aufkonzentriert werden, um das Volumen zu verringern. Dazu wird die Probe in Ultrafiltrationseinheiten (Amicon Ultra-4 Filter, 30 kDa MWCO; Millipore) zentrifugiert (10°C, 6000 Upm, Rotor 1015, Hettich), bis sie nur noch ein Volumen von ca. 100-500 µl besitzt. Die native PAGE wird mit 1,5 mm dicken PAA-Gelen und detergenschneiem Laufpuffer durchgeführt. Danach wird die dominante grüne Hauptbande aus dem Gel ausgeschnitten und das Protein mit der „*crush and soak*“-Methode extrahiert. Jeweils ca. 5 Gelstückchen werden dazu in ein Reaktionsgefäß gegeben, mit 600 µl 10 mM NaP pH 7,4 versetzt und mit einem Plastikstößel zerrieben. Um eine möglichst vollständige Diffusion des WSCP aus dem Gel in den Puffer zu erreichen, wird die Probe über Nacht auf Eis inkubiert. Danach wird die Probe zentrifugiert (15 Min., 4°C, 18000 Upm, Rotor 1195, Hettich), um die Gelreste zu pelletieren. Der grüne Überstand wird wie oben beschrieben in einem Amicon Ultra-4 Filter auf ein Volumen von ca. 500 µl eingeeengt.

In einem letzten Aufreinigungsschritt wird eine Gelfiltration durchgeführt. Als Säulenmaterial wird Sephacryl S-200 HR (Amersham Biosciences; Trennbereich 5-250 kDa) verwendet. Die Säule (5 ml Säulenvolumen) wird mit 10 mM NaP pH 7,8 äquilibriert. Anschließend wird die aufkonzentrierte WSCP-Probe aufgetragen und mit 10 mM NaP pH 7,8 eluiert. Das grüne Eluat, welches das native, aufgereinigte WSCP enthält, kann bei -20°C gelagert werden. Das Sephacryl-Säulenmaterial kann regeneriert und wiederverwendet werden (s.u.).

Aus 500 g Blumenkohlblättern können ca. 4 mg natives WSCP gewonnen werden.

Regeneration der DEAE-Säule

Zunächst wird das Säulenmaterial mit dem 4-fachen Säulenvolumen dH₂O gewaschen und dabei mehrmals resuspendiert. Danach wird die Säule jeweils mit dem 2-fachen

Säulenvolumen 2 M NaCl und dann 0,5 M NaOH gewaschen. Abschließend wird die Säule mit dem 5-fachen Säulenvolumen dH₂O gewaschen und schließlich in 20% Ethanol bei 4°C gelagert.

Regeneration der Sephacryl-Säule

Zunächst wird die Säule mit dem 3-fachen Säulenvolumen 10 mM NaP pH 7,8 gewaschen. Darauf folgt ein Waschschrift mit drei Säulenvolumina 1% SDS, wobei das Säulenmaterial mehrfach resuspendiert wird. Anschließend wird jeweils mit dem 4-fachen Säulenvolumen 10 mM NaP pH 7,8 und dann dH₂O gewaschen. Schließlich wird das Säulenmaterial in 20% Ethanol bei 4°C gelagert.

3.1.5 Überexpression von rekombinantem WSCP in *E.coli*

Das für diese Arbeit benötigte Apoprotein wurde in Bakterien überexprimiert und als lösliches Protein sowie als unlösliche, sogenannte „Inclusion Bodies“ (IBs), im Cytoplasma der Bakterien angehäuft. Für alle Versuche in dieser Arbeit wurde ausschließlich das lösliche Protein verwendet (Begründung s. 4.1.2.1). Als Wirtsstämme wurden die *Escherichia coli*-Varianten JM 101 (Klone BoWSCP_{His} und mBoWSCP_{His}) bzw. Rosetta(DE3) (Klon AtWSCP_{His}) verwendet, in die durch Transformation jeweils ein Plasmid mit einem genetisch veränderten WSCP-Gen eingeführt wurde. So ist es möglich, größere Mengen an Apoprotein zu gewinnen. Das WSCP-Gen steht dabei im Expressionsplasmid (pDS12/RBSII) unter der Kontrolle des Lac-Operons und kann somit durch Zugabe von IPTG (Isopropylthiogalaktosid) induziert werden. IPTG bindet als Strukturanalogon der Lactose an den Repressor, wodurch der Promotor frei wird und die Transkription des WSCP-Gens ablaufen kann.

Folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten WSCP-Klone:

Tab. 3-3: In dieser Arbeit verwendete WSCP-Klone.

Protein	Klonname	<i>E. coli</i> Stamm	Kurzbeschreibung
WSCP aus <i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> (Blumenkohl)	BoWSCP _{His}	JM101	Volllängenprotein ohne Präsequenz, mit N-terminalem Hexahistidylrest (Gesamtlänge 210 AS)
WSCP aus <i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> (Blumenkohl)	mBoWSCP _{His}	JM101	wie BoWSCP _{His} , aber die 10 C-terminalen AS sind deletiert (Gesamtlänge 200 AS); entspricht dem murenen nativen BoWSCP
WSCP aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	AtWSCP _{His}	Rosetta (DE3)	Volllängenprotein ohne Präsequenz, mit C-terminalem Hexahistidylrest

Material:

LB-Medium	[1% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) NaCl; pH 7,5 (NaOH)], steril
LB-Amp-(CAP-)Platten	[1% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) NaCl; 1.5% Agar; pH 7,5 (NaOH)], steril; Nach dem Autoklavieren – kurz vor dem Gießen – Antibiotika zufügen, wenn das Medium etwas abgekühlt ist: 100 µg/ml Amp (34 µg/ml CAP)
Ampicillin (Amp)	[100 mg/ml]
Chloramphenicol (CAP)	[34 mg/ml]
1 M IPTG	
Lysispuffer W	[50 mM NaP pH 8.0; 300 mM NaCl; 15 mM Imidazol]

Vorkultur ansetzen:

Von einer Dauerkultur des benötigten WSCP-Klons in JM101- bzw. Rosetta(DE3)-Zellen wird ein Verdünnungsausstrich auf einer LB-Amp-Platte (LB-Amp-CAP-Platte bei AtWSCPhis) durchgeführt und über Nacht bei 32°C inkubiert. Die Platte wird mit dem Deckel nach unten in den Wärmeschrank gestellt, um ein durch heruntertropfendes Kondenswasser bedingtes Vermischen der vereinzelter Bakterienkolonien zu verhindern. Am darauf folgenden Tag wird aus einer der Einzelkolonien eine Vorkultur in 50 ml antibiotikahaltigem LB-Medium (Amp: 100 µg/ml; bei AtWSCPhis zusätzlich 34 µg/ml CAP) angesetzt und erneut über Nacht bei 37° inkubiert, diesmal auf einem Schüttler bei 200 UpM.

Überexpression:

Am folgenden Tag werden 20 ml der Vorkultur für die Hauptkultur zur Überexpression von rekombinatem WSCP in 1l antibiotikahaltiges (Konzentrationen wie bei der Vorkultur) LB-Medium überführt. Die Hauptkultur wird bei 200 UpM und 28°C inkubiert, bis sie eine optische Dichte (OD) bei 550 nm von ca. 0,5 erreicht (ca. 3-4 Stunden). Nun wird die Überexpression des WSCP induziert durch Zugabe von 1 ml IPTG (1 mM Endkonzentration) und die Kultur über Nacht weiter unter denselben Bedingungen inkubiert.

Die Expression der rekombinanten Proteine wird durch die Zentrifugation der Bakterienkultur beendet (3 min, 4°C, 8.000 UpM, Rotor: JLA 10.500, Beckmann). Der Überstand wird verworfen und das Bakterienpellet in Lysispuffer W aufgenommen und homogen suspendiert. Pro 1l Hauptkultur werden 50 ml Lysispuffer W verwendet. Die Bakterien werden entweder direkt lysiert oder bis zur Lyse bei -20°C aufbewahrt.

Zur Lyse wird die Bakteriensuspension dreimal mit 1.200 PSI (83 bar) durch eine hydraulische Hochdruckpresse, die *French Press* (FRENCH®Pressure Cell Press), gepresst. Das Lysat wird dabei immer auf Eis gekühlt. Anschließend werden die unlöslichen Zellbestandteile (darunter auch die WSCP-IBs) abzentrifugiert (30 min, 4°C, 10000 x g). Der Überstand mit dem löslichen rekombinanten WSCP, der in dieser Arbeit als *French-Press-Überstand* (FPÜ) bezeichnet wird, wird nach Bedarf aliquotiert und die Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

3.1.6 Quantifizierung von WSCP

3.1.6.1 WSCP-Apoprotein

Nach der Präparation von WSCP folgt die Konzentrationsbestimmung. Da sich das Protein im *French-Press*-Überstand (FPÜ) befindet, welcher auch die gesamten löslichen Proteine der Bakterien enthält, muss das WSCP erst aufgereinigt werden, bevor seine Konzentration bestimmt werden kann. Dazu wird es über seinen Hexahistidylrest an einer mit Ni²⁺-Ionen beladenen Sepharosesäule (Chelating Sepharose™ Fast Flow, Amersham Biosciences) immobilisiert und kann so durch Waschschriffe von den bakteriellen Verunreinigungen befreit werden. Die dabei verwendete Methode ist dieselbe wie bei der Rekonstitution, die in 3.1.8.1 beschrieben ist, außer dass die Pigmentbindungs- und -waschschriffe ausgelassen werden.

Nach Elution des aufgereinigten WSCPs von der Säule kann die Konzentration über den Gehalt an aromatischen Aminosäuren per UV-Absorptionsspektroskopie (s. 3.1.15.1.1) bestimmt werden. Gemessen wird in diesem Fall die Absorbanz bei 280 nm, bei der die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin absorbieren. Für rekombinantes WSCP werden die in Tab. 3-4 angegebenen molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ) verwendet. Da sich das Protein in Elutionspuffer befindet (s. 3.1.8.1), wird dieser Puffer auch als Referenz für die Absorptionsmessung benutzt.

Tab. 3-4: Proteinparameter der verwendeten WSCP-Klone für die Bestimmung der Proteinkonzentration über die Absorption bei 280 nm. Die Werte wurden mit dem Programm ProtParam von ExPASy (s. 8.6) berechnet, anhand der Aminosäuresequenz der Proteine. Die Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten (grau hinterlegt) gilt für das reduzierte Protein.

WSCP-Klon	MW (Da)	ϵ_{280} (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Konzentration (M) bei A ₂₈₀ =1	Konzentration (mg/ml) bei A ₂₈₀ =1
BoWSCP _{His}	22987	26930	3,7 * 10 ⁻⁵	0,85
mBoWSCP _{His}	21734	25440	3,9 * 10 ⁻⁵	0,85
AtWSCP _{His}	21772	23950	4,1 * 10 ⁻⁵	0,90

3.1.6.2 Chl-WSCP

Für die Proteinquantifizierung des pigmentierten WSCPs wird zunächst ein vollständiges Absorptionsspektrum (im sichtbaren und UV-Bereich, 750-250 nm) der Chl-WSCP-Komplexe gemessen (s. 3.1.15.1). Die gebundenen Chlorophylle tragen zu der Absorption bei 280 nm bei. Um die Proteinkonzentration über die Absorption bei 280 nm zu bestimmen, wie in 3.1.6.1 beschrieben, muss demnach der Chl-Anteil an der Gesamtabsorption bei 280 nm bestimmt und subtrahiert werden.

Handelt es sich um Chl-WSCP-Komplexe, die sowohl Chl *a* als auch Chl *b* enthalten, muss dafür zuerst das Chl-*a/b*-Verhältnis in den Chl-WSCP-Komplexen durch Pigmentextraktion (s. 3.1.9) und anschließender HPLC-Analyse (s. 3.1.3.1) bestimmt werden. Anschließend werden die Absorptionsspektren von reinem Chl *a* bzw. *b* (in Ethanol) in diesem Verhältnis

rechnerisch addiert und das resultierende Summenspektrum auf die Rotabsorption des zuvor gemessenen Chl-WSCP-Spektrums normiert. Für Chl-WSCP-Komplexe mit einem Chl-*a/b*-Verhältnis > 3 kann dabei entweder auf das Rotabsorptionsmaximum normiert werden oder auf die Rotabsorptionsfläche im q_x/q_y -Bereich (550-750 nm), ohne einen signifikanten Unterschied des resultierenden A_{280} -Wertes für die Chlorophyllabsorption zu sehen. Für Chl-*b*-WSCP-Komplexe und diejenigen mit einem Chl-*a/b*-Verhältnis < 3 sollte die Normierung auf den q_x/q_y -Bereich erfolgen, da sonst der Chl-Anteil an der Gesamtabsorption bei 280 nm überschätzt wird (vgl. 4.1.4). Schließlich kann der Chl-Absorptionsanteil bei 280 nm subtrahiert werden und der daraus ermittelte A_{280} -Wert mit dem molaren Extinktionskoeffizienten des WSCP-Apoproteins (s. 3.1.6.1) verrechnet werden, um die Proteinkonzentration zu ermitteln.

Hinweis:

Obwohl die Lage des Rotabsorptionsmaximums des freien Chlorophylls nicht mit der Lage des Rotmaximums des Chl-WSCP-Komplexes übereinstimmt, wird für die Normierung das Chl-Spektrum nicht verschoben, da sonst alle anderen Maxima mitverschoben würden. In Abschnitt 4.1.6.1 ist beschrieben, dass die Bindung an WSCP keinen Einfluss auf die Chl-Absorption bei 280 nm zu haben scheint – somit ist eine signifikante Verschiebung des Chl-Spektrums in diesem Bereich nach Proteinbindung unwahrscheinlich.

3.1.7 Bestimmung des Chl/Protein-Verhältnisses der Chl-WSCP-Komplexe

Die Chlorophylle werden aus dem Pigment-Protein-Komplex mit 2-Butanol *quantitativ* extrahiert, wie in 3.1.9.1.2 beschrieben. Anschließend werden sie mittels analytischer HPLC (s. 3.1.3.1) quantifiziert. Das Protein wird wie in 3.1.6.2 beschrieben quantifiziert.

3.1.8 Rekonstitution von rekombinantem WSCP

Unter dem Begriff „Rekonstitution“ ist in dieser Arbeit die Zusammenführung von Chl und WSCP-Apoprotein unter Ausbildung des Pigment-Protein-Komplexes gemeint.

3.1.8.1 Standardrekonstitutionsmethode

In dieser Arbeit wurde ausschließlich das als lösliches Protein exprimierte WSCP, welches im *French-Press*-Überstand (FPÜ) enthalten ist, für Rekonstitutionen und anschließende Versuche verwendet. Die rekombinanten WSCP-Klone enthalten alle einen Hexahistidylrest (s. Tab. 3-3), über den das Protein an einer mit Ni^{2+} -Ionen beladenen Sepharosematrix gebunden und aufgereinigt werden kann. Auf diese Weise wurde auch die Standardrekonstitution des WSCP mit Chl (und auch Chlid) durchgeführt, d.h. Rekonstitution und Aufreinigung wurden gleichzeitig durchgeführt.

Material:

WSCP-Apoprotein (FPÜ aus der WSCP-Überexpression, s. 3.1.5)

Chlorophyll (TE oder Einzelchlorophylle, s. 3.1.1)

100% Ethanol, p.a.

Chelating Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences)

0,3 M NiCl₂

50 mM NaP, pH 7,8

NaP-OG-Puffer [50 mM NaP pH 7,8; 1% (w/v) OG; 12,5% (w/v) Saccharose → pH überprüfen und ggf. auf pH 7,8 einstellen mit NaOH]]

Prä-Elutionspuffer [20 mM NaP pH 7,4; 25 mM Imidazol → pH überprüfen und ggf. auf pH 7,8 einstellen mit H₃PO₄]

Elutionspuffer [20 mM NaH₂PO₄; 0,3 M Imidazol → pH 7,8 einstellen mit H₃PO₄; 2 mM β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)]

dH₂O

Vorbereitung der Säule:

Die benötigte Menge Sepharose (suspendiert in 20% Ethanol) wird in eine Säulenkartusche pipettiert. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich mit einer Säulenbeladung von 2 mg Protein pro ml (nach Abtropfen des Ethanols) Säulenmaterial gearbeitet; es können jedoch bis zu 5 mg Protein pro ml Säulenmaterial gebunden werden. Die Säule wird vorsichtig mit dem 2-fachen Säulenvolumen dH₂O gespült und anschließend vorsichtig (!) mit dem 2-fachen Säulenvolumen 0,3 M NiCl₂ überschichtet. Die abtropfende Flüssigkeit wird separat abgefangen und in den Nickel-Abfall gegeben (das gilt für alle Ni-haltigen Eluate!). Überschüssiges NiCl₂ wird durch Waschen mit dem 5-fachen Säulenvolumen dH₂O entfernt. Vor dem Probenauftrag wird die Säule mit dem 5-fachen Säulenvolumen 50 mM NaP pH 7,8 äquilibriert.

Rekonstitution:

Da WSCP hitzestabil ist, wird die Rekonstitution bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Pigmente wird bei allen Arbeitsschritten mit Pigment abgedunkelt gearbeitet.

Vor dem Auftrag auf die Säule wird der FPÜ mit einer Spritze durch einen Sterilfilter (Ø 0,2 µm) filtriert, um Aggregate zu entfernen. Sowohl der aufgetaute FPÜ als auch das Filtrat werden vor dem Auftrag auf die Säule auf Eis gehalten, um die Probe vor Proteaseverdau zu schützen. Bei sehr großen Volumina kann die Filtration auch über einen Papierfilter erfolgen – dies sollte allerdings im Kühlraum stattfinden, um den FPÜ im Filter kalt zu halten, da es einige Zeit dauern kann, bis das gesamte Probenvolumen durch den Filter gelaufen ist. Dann wird die benötigte Menge filtrierter FPÜ auf die Säule pipettiert (zur Konzentrationsbestimmung von WSCP im FPÜ s. 3.1.6.1). Um Verunreinigungen durch die im FPÜ enthaltenen bakteriellen Proteine zu entfernen, wird die Säule nun mit dem 10-fachen Säulenvolumen 50 mM NaP pH 7,8 gewaschen – dabei wird das Säulenmaterial mehrfach aufgeschlämmt und kräftig umgerührt.

Vor Zugabe der Pigmentlösung wird die Säule mit dem 5-fachen Säulenvolumen NaP-OG-Puffer äquilibriert. Die für die Rekonstitution benötigten Pigmente (TE oder Einzelchloro-

phylle; 5-fach molarer Überschuss zu WSCP) werden in einer Konzentration von 10 mg/ml in 100% Ethanol vollständig gelöst (Ultraschall!) und anschließend unter kräftigem Vortexen 20-fach mit NaP-OG-Puffer verdünnt. Um mögliche Aggregate zu entfernen wird die Pigmentlösung 5 Min. bei 6000 Upm (Rotor 1015, Hettich) und 15 °C zentrifugiert. Danach wird die Pigmentlösung auf die mit WSCP beladene Säule pipettiert und vollständig einlaufen lassen. Der Säulenfluss wird dann gestoppt und das Säulenmaterial mit der restlichen, noch überstehenden Pigmentlösung vermischt. Die Säule wird nun bei Raumtemperatur und abgedunkelt ca. 1 Stunde inkubiert. Anschließend wird die Säule mit dem 30-fachen Säulenvolumen NaP-OG-Puffer gewaschen, um ungebundenes Chl vollständig zu entfernen – dabei wird das Säulenmaterial mehrfach aufgeschlämmt und kräftig umgerührt.

Um das Detergens zu entfernen wird die Säule nun mit dem 10-fachen Säulenvolumen NaP pH 7,8 gewaschen. Darauf folgt ein letzter Reinigungsschritt, um mögliches noch vorhandenes, schwach an die Säule bindendes bakterielles Protein zu entfernen. Dazu wird die Säule mit dem 10-fachen Säulenvolumen Prä-Elutionspuffer gewaschen und dabei wieder gelegentlich aufgeschlämmt und umgerührt. Schließlich wird das rekonstituierte Chl-WSCP durch Zugabe von Elutionspuffer (ca. 5-10-faches Säulenvolumen) langsam (!) eluiert; das grüne Eluat wird aufgefangen.

3.1.8.2 Rekonstitution in Lösung

Bei einigen Experimenten wurde WSCP-Apoprotein mit freien Pigmenten (Chl und/oder Chlid) gemischt, ohne dabei an einer Ni-Sepharosesäule immobilisiert zu sein. Die Pigmente wurden dabei von WSCP gebunden und eventuell vorhandener Pigmentüberschuss wurde anschließend an diese „Rekonstitution in Lösung“ mittels nativer PAGE (s. 3.1.12.2) oder Ultrazentrifugation in Saccharose-Dichtegradienten (s. 3.1.14) von den Pigment-Protein-Komplexen abgetrennt.

Material:

WSCP-Apoprotein (FPÜ aus der WSCP-Überexpression, s. 3.1.5)
Chl oder Chlid (bei Chl: Einzelpigmente oder TE)
100% Ethanol, p.a.
10% (w/v) Octylglucosid (OG)
1M β -Mercaptoethanol (frisch ansetzen!)

Die Rekonstitutionsschritte werden bei RT durchgeführt.

Das Volumen FPÜ, welches die gewünschte Menge WSCP enthält, wird auf Endkonzentrationen von 1% OG und 2 mM β -Mercaptoethanol gebracht. Die entsprechend benötigte Menge Chl oder Chlid (1- bis 5-fach molarer Überschuss, je nach Versuchsbedingungen) wird in einer Konzentration von 10 mg/ml in 100% Ethanol gelöst und dabei stark gevortext. Die gelösten Pigmente werden kurz mit Ultraschall behandelt, um sicherzustellen, dass sie vollständig gelöst sind. Unter starkem Vortexen wird nun die Pigmentlösung mit der Proteinlösung gemischt und anschließend mindestens 10 Min. bei RT vor Licht geschützt inkubiert.

3.1.9 Extraktion der WSCP-gebundenen Pigmente

Zur Pigmentanalyse der aufgereinigten rekonstituierten Pigment-Protein-Komplexe muss man zunächst die Pigmente aus den Komplexen extrahieren. Da WSCP einen äußerst stabilen Pigment-Protein-Komplex bildet, ist es sehr schwierig, die Pigmente quantitativ zu extrahieren. Man muss bei der Extraktion so „hart“ vorgehen, dass das Risiko besteht, die Pigmente zu zerstören. Es muss deshalb besonders gut darauf geachtet werden, dass die Pigmente vor Licht geschützt werden.

3.1.9.1 Pigmentextraktion aus WSCP in Lösung

Material:

dH₂O
10% (w/v) SDS
2-Butanol
5 M NaCl
70% Aceton (gepuffert mit 0,2 mM TrisHCl pH 7)

3.1.9.1.1 Qualitative Pigmentextraktion

Zunächst müssen die Komplexe destabilisiert werden, um die Bindung der Pigmente zu schwächen und sie so leichter extrahierbar zu machen. Dazu werden 100 µl Probe mit 11 µl 10% SDS versetzt (Endkonzentration SDS: 1%) und stark gevortext. Dann werden zur Extraktion der Pigmente 66 µl 2-Butanol zugegeben und die Probe erneut stark gevortext. Um die Phasentrennung zu verbessern werden noch 10 µl 5 M NaCl zugegeben, wieder gevortext und die Probe anschließend zentrifugiert (2 Min., RT, 14000 UpM, Tischzentrifuge). Die pigmenthaltige, obere Butanolphase wird fast vollständig abpipettiert und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Das ungefähre Butanolvolumen wird bestimmt und die Probe wird mit dem doppelten Volumen 70% Aceton vermischt. Die Probe kann nun mittels analytischer HPLC (s. Punkt 3.1.3.1) bezüglich ihres Pigmentgehalts untersucht werden.

3.1.9.1.2 Quantitative Pigmentextraktion

Bis zur ersten Zentrifugation wird genauso verfahren wie bei der qualitativen Pigmentextraktion. Nach dem Zentrifugationsschritt wird die Butanolphase jedoch in ein *vorgewogenes* Reaktionsgefäß gegeben. Zur ursprünglichen Probe werden noch mal ca. 20-50 µl 2-Butanol gegeben und wieder gevortext und zentrifugiert wie oben beschrieben. Die Butanolphase wird diesmal so vollständig wie möglich abpipettiert und mit der ersten Butanolphase vereint. Das Reaktionsgefäß wird ein zweites Mal gewogen, um die Masse des Butanols zu bestimmen, und das genaue Butanolvolumen über die Formel: $V = m / \rho$ bestimmt ($\rho_{(2\text{-Butanol})} = 0,81 \text{ g/ml}$). Das entsprechende 2-fache Volumen 70% Aceton wird berechnet und mit dem butanolischen Pigmentextrakt gemischt. Die Probe kann nun mittels analytischer HPLC (s. Punkt 3.1.3.1) auf ihren Pigmentgehalt untersucht werden.

Eine möglichst vollständige Pigmentextraktion gelingt, wenn man nach der SDS-Zugabe die Probe 1 Min. bei 100°C im Wasserbad kocht. Sie muss dabei mit Alufolie umwickelt werden,

damit die Pigmente vollständig vor Licht geschützt sind. Dieser Arbeitsschritt birgt leider aber auch große Gefahr, dass die Pigmente zerstört werden und derivatisieren.

Für die Auswertung der HPLC-Daten ist noch zu beachten:

1 ml 2-Butanol + 2 ml 70% Aceton ergeben insgesamt nicht 3 ml, sondern bloß 2,9 ml Endvolumen. Das berechnete Gesamtvolumen aus der quantitativen Pigmentextraktion wird für die Auswertung demnach noch mit dem Umrechnungsfaktor 0,967 (= 2,9 / 3) multipliziert.

3.1.9.2 Pigmentextraktion aus „grünen“ Polyacrylamid-Gelen

Material:

s. 3.1.9.1
50 mM NaP pH 7,8

Qualitative Pigmentextraktion:

Die zu untersuchende pigmentierte Bande wird mit einem Skalpell aus dem PAA-Gel ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß gegeben und darin mit einem Stößel zerrieben, bis keine großen Gelstücke mehr zu sehen sind. Danach folgt die Zugabe von 100 µl 50 mM NaP pH 7,8 und weiteres Zerreiben. Mit einer zweiten Zugabe von 100 µl 50 mM NaP pH 7,8 wird anschließend der Stößel abgespült und aus dem Reaktionsgefäß entfernt. Die Probe wird gevortext und anschließend bei RT und vor Licht geschützt auf einer Drehplatte inkubiert – am besten über Nacht –, damit die Pigment-Protein-Komplexe aus den Gelresten in den Puffer diffundieren.

Nach der Inkubation werden die Gelreste abzentrifugiert (10 Min., 4°C, 18000 Upm, Rotor 1195, Hettich). Der Überstand wird vorsichtig abgehoben und in ein frisches Reaktionsgefäß pipettiert. Falls die Gelreste noch sichtbar gefärbt sind, wird erneut NaP zugegeben, die Probe ca. 1-2 Stunden nachextrahiert und der zweite Überstand mit dem ersten vereinigt. Es wird weiter verfahren wie unter 3.1.9.1.1 (bei einer qualitativen Pigmentextraktion) bzw. 3.1.9.1.2 (bei einer quantitativen Pigmentextraktion) beschrieben. Die Volumina der Reagenzien werden dem Probenvolumen entsprechend angepasst.

3.1.10 Versuche mit rekombinantem WSCP

3.1.10.1 Chl-Insertion

In nativem sowie rekombinantem BoWSCP sind zwei Chlorophylle pro Tetramer gebunden (Hughes *et al.*, 2006; Satoh *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 2003; sowie eigene Ergebnisse, s. 4.1.4), obwohl es vier Chl-Bindungsstellen gibt. Ziel des Chl-Insertionsversuchs war es, alle vier Chl-Bindungsstellen in WSCP zu besetzen. Um die Auswertung zu erleichtern, wurde rein Chl *a* bzw. rein Chl *b* haltiges BoWSCP_{his} für die Insertionsversuche verwendet, dem das jeweils andere Chl angeboten wurde. So konnte schon mit bloßem Auge anhand der

Grünfärbung erkannt werden, ob Chl *b* von Chl-*a*-WSCP aufgenommen wurde und umgekehrt.

Material:

1,5%-OG-Puffer [1,5% (w/v) OG; 10 mM NaP pH 7,8]
Ethanol (p.a.)
50 mM NaP pH 7,8
Chl-*a*- und Chl-*b*-mBoWSCP his
Chl *a* und Chl *b* (getrocknet)

Jede Probe wird doppelt angesetzt. Es werden pro Probe 600 µg Protein (Chl-*a*- bzw. Chl-*b*-mBoWSCP his, rekonstituiert wie in 3.1.8.1 beschrieben) eingesetzt. Die Konzentration wird mit Elutionspuffer (s. 3.1.8.1) so eingestellt, dass 600 µg Protein in 100 µl sind. Für die Chl-Insertion wird jeweils ein 5-fach molarer Überschuss an Pigment zu Protein verwendet. Für die Pigmentlösung werden daher je Probe 125 µg Chl (*a* oder *b*) in 12,5 µl Ethanol (p.a.) gelöst (Ultraschall!) und unter Vortexen zu 200 µl 1,5%-OG-Puffer gegeben. Unter kräftigem Vortexen werden nun 200 µl Pigmentlösung zu 100 µl Proteinlösung gegeben. Als Kontrolle wird einer Probe nur OG-Puffer mit Ethanol (ohne Chl) zugegeben. Nach dem Mischen von Pigment- und Proteinlösung wird jeweils eine der beiden identischen Proben 20 Min. bei 100°C im Wasserbad gekocht (vollständig vor Licht schützen!), anschließend einige Sekunden auf Eis abgekühlt und anschließend 1 St. bei RT und vor Licht geschützt inkubiert. Das Erhitzen soll dazu dienen, die kinetische Energie soweit zu erhöhen, dass die kompakten, stabilen Pigment-Protein-Komplexe „aufgelockert“ werden und so eventuell die Pigmentinsertion erleichtert wird. Bei der anderen Probe wird der Kochschritt weggelassen.

Ungebundenes, freies Pigment muss anschließend von den Pigment-Protein-Komplexen abgetrennt werden. Dazu werden zwei verschiedene Methoden angewandt, um die Ergebnisse vergleichen zu können: native PAGE und Ultrazentrifugation.

Für die native PAGE werden 200 µg WSCP von jeder Probe verwendet, mit 1/10 Endvolumen 80%igem Glycerin versetzt und die Elektrophorese in einem 8%igem PAA-Gel wie in 3.1.12.2 beschrieben durchgeführt. Anschließend wird von jeder Probe die grüne Tetramerbande ausgeschnitten und in einem Reaktionsgefäß mit einem Stößel zerstoßen. Um die Pigment-Proteinkomplexe aus den zerstoßenen Gelstücken zu extrahieren werden 200 µl 50 mM NaP pH 7,8 zugegeben, gevortext und die Probe über Nacht bei RT auf einer Drehplatte inkubiert. Danach werden die Gelreste abzentrifugiert (5 Min., 4°C, 18000 Upm, Rotor 1195, Hettich). Der Überstand wird vorsichtig abgehoben und in ein frisches Reaktionsgefäß pipettiert. Falls das Gelpellet noch deutlich grün gefärbt ist, wird noch einmal extrahiert wie eben beschrieben und der zweite Überstand mit dem ersten vereint.

Für die Auftrennung mittels Ultrazentrifugation werden 400 µg Protein von jeder Probe verwendet und in detergensfreien 0,3 M Saccharosedichtegradienten zentrifugiert wie in 3.1.14 beschrieben. Anschließend wird von jeder Probe die grüne Tetramerbande vorsichtig mit einer Spritze aus dem Gradienten abgesaugt.

Um den Chl-Insertionsversuch auszuwerten muss das Chl/Protein-Verhältnis jeder Probe bestimmt werden. Dazu wird zunächst von allen Proben ein Absorptionsspektrum im UV-Vis-Bereich (750-250 nm) gemessen (s. 3.1.15.1). Die Proteinkonzentration wird daraus wie in 3.1.6.2 beschrieben ermittelt. Die Chl-Konzentration sowie das Chl-a/b-Verhältnis werden mittels HPLC-Analyse bestimmt, nach quantitativer Extraktion der Pigmente mit Butanol (s. 3.1.9.1.2).

3.1.10.2 Chl/Chlid-Austausch

Schmidt *et al.* (2003) stellten fest, dass rekombinantes BoWSCP, welches mit Chlid anstelle von Chl pigmentiert ist, nicht als Tetramer, sondern als Monomer vorkommt. Es sollte daher in dieser Arbeit versucht werden, eine reversible Tetramerisierung/Monomerisierung von pigmentierten BoWSCP-Phis-Komplexen zu erreichen, indem Chlid gegen Chl ausgetauscht wird und umgekehrt.

Der Versuch entspricht in der Durchführung und Auswertung der Chl-Insertion (s. 3.1.10.1). Chl-WSCP-Komplexen wird Chlid (*a/b*-Verhältnis = 1) angeboten und umgekehrt. Es wird jedoch keine der Proben gekocht, da Chlid-WSCP im Gegensatz zu Chl-WSCP nicht hitzestabil ist.

3.1.10.3 Interaktion zwischen WSCP und LHCII

Das WSCP-Apoprotein kann *in vitro* Chlorophylle aus Thylakoiden entfernen (Sato *et al.*, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurde demnach untersucht, ob LHCII als potentieller Interaktionspartner für WSCP in Frage kommt. Dazu wurde nativer LHCII mit BoWSCP-Phis-Apoprotein, welches an einer Ni-Sepharose-Matrix immobilisiert vorlag, inkubiert, die beiden Proteine durch Herauswaschen des LHCs anschließend wieder voneinander getrennt und dann der LHC mittels HPLC-Analyse auf seine Pigmentzusammensetzung untersucht. Es wurden auch die spektroskopischen Eigenschaften der LHCII-Komplexe vor und nach Inkubation mit WSCP untersucht.

Der bei diesem Versuch verwendete native LHCII wurde freundlicherweise von Dr. Manuel Lion zur Verfügung gestellt. Die Isolierung und Aufreinigung des nativen LHCII ist in Lion, 2005 (Dissertation) beschrieben.

Material:

OG-Puffer [1% (w/v) OG; 50 mM NaP pH 7,8]

LM-Puffer [0,1% (w/v) LM; 50 mM NaP pH 7,8]

50 mM NaP pH 7,8

Amicon Ultra-4 Filter (30 kDa MWCO, Millipore)

Saccharose-Dichtegradienten [0,4 M Saccharose; 20 mM NaP pH 7,8; 0,1% (w/v) LM]

nativer LHCII (ca. 800 µg)

BoWSCP-Phis-Apoprotein (3 mg, in FPÜ aus WSCP-Überexpression, s. 3.1.5)

3.1.10.3.1 Vorbereitung der LHCII-Probe

Bei diesem Versuch ist es sehr wichtig, dass die verwendete LHCII-Probe nur intakte Pigment-Protein-Komplexe enthält und nicht mit freiem Pigment verunreinigt ist. Vor Beginn des eigentlichen Versuchs wird daher die LHCII-Probe diesbezüglich aufbereitet und untersucht. Als erstes wird möglicherweise noch vorhandenes freies Pigment mittels Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation (s. 3.1.14) entfernt. Es werden ca. 400 µg LHCII (Konzentration: ca. 1 mg/ml, gelöst in OG-Puffer) pro Dichtegradient aufgetragen und über Nacht zentrifugiert (17 St., 4°C, 37000 Upm, Rotor SW40, Beckmann). Anschließend wird mit einer Spritze vorsichtig jeweils die Trimerbande des LHCII aus den Gradienten abgesaugt und in einem Reaktionsgefäß vereint.

Von der Probe werden Absorptions-, CD- und Fluoreszenz-Spektren gemessen, um den LHCII zu quantifizieren und um zu überprüfen, ob es sich um intakte Trimere handelt. Die spektroskopischen Messungen werden durchgeführt wie in 3.1.15.1, 3.1.15.2.1 und 3.1.15.3 beschrieben. Die Quantifizierung des LHCII erfolgt über den molaren Extinktionskoeffizienten des LHCII bei 670 nm: $\epsilon = 5,46 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$, nach Butler und Kühlbrandt (1988). Dieser Wert gilt für LHCII-Monomere. Um die Konzentration der LHCII-Trimere zu berechnen, wird der Wert entsprechend durch 3 geteilt.

3.1.10.3.2 Interaktionsversuch

Es werden 3 mg rekombinantes WSCP und 33 µg nativer LHCII eingesetzt; das entspricht einem 100-fach molaren Überschuss von WSCP zu LHCII, auf das jeweilige Monomer bezogen ($MW_{(\text{BoWSCP}_{\text{His}})} = 22.987 \text{ Da}$; $MW_{(\text{LHCII})} = 25.000 \text{ Da}$). Die Konzentration des LHCII wird mit LM-Puffer auf 66 µg/ml eingestellt. Insgesamt werden 1,5 ml der LHCII-Lösung benötigt.

Zwei Ni-Sepharose-Säulen mit je 1 ml Säulenvolumen werden in einer Säulenkartusche vorbereitet wie in 3.1.8.1 beschrieben. Eine Säule dient als Kontrollsäule, auf welcher LHCII ohne WSCP inkubiert wird. An die andere Säule wird das rekombinante WSCP über seinen Hexahistidylrest gebunden und mit nativem LHCII inkubiert, wie im Folgenden beschrieben.

3 mg BoWSCP_{His} (enthalten in FPÜ) werden auf eine der Säulen geladen und das Säulenmaterial danach mit dem 20-fachen Säulenvolumen 50 mM NaP pH 7,8 gewaschen und dabei immer wieder resuspendiert, um bakterielle Verunreinigungen aus dem FPÜ zu entfernen. Beide Säulen werden nun mit dem 5-fachen Säulenvolumen LM-Puffer äquilibriert und das Säulenmaterial anschließend jeweils in ein Reaktionsgefäß mit 2 ml Fassungsvermögen transferiert. Beide Proben werden einige Sekunden lang anzentrifugiert (Tischzentrifuge), damit sich das Säulenmaterial absetzt, und der Überstand jeweils verworfen. Das Säulenmaterial wird von nun an auf Eis gehalten.

In die Reaktionsgefäße werden jeweils 500 µl LHCII-Lösung (entsprechend 33 µg LHCII) pipettiert und durch Vortexen mit dem Säulenmaterial vermischt. Die Proben werden anschließend bei 4°C und vor Licht geschützt auf einer Drehplatte 24 St. inkubiert. Die restlichen 500 µl LHCII-Lösung werden für die Auswertung gebraucht: sie dienen als Probe

„t = 0“, um den Zustand des LHCII vor Inkubation mit WSCP bzw. vor Inkubation mit der Ni-Sepharose-Matrix (Kontrollprobe) zu erfassen.

Nach der Inkubation müssen LHCII und WSCP wieder voneinander getrennt werden. Bei der Kontrollprobe muss der LHCII wieder vom Säulenmaterial getrennt werden. Dazu werden beide Versuchsansätze jeweils wieder zurück in eine Säulenkartusche transferiert. Die Säulen werden so lange mit LM-Puffer gewaschen, bis der Durchfluss farblos erscheint. Dabei wird von beiden Säulen jeglicher grüner Durchfluss (LHCII) aufgefangen und auf Eis aufbewahrt. Der Durchfluss wird anschließend in Amicon Ultra-4 Filtern (30 kDa MWCO) bei 4°C und 6000 Upm (Rotor, 1015, Hettich) jeweils auf ein Volumen von ca. 200 µl aufkonzentriert. Die Amicon-Filter werden mit ca. 100 µl LM-Puffer ausgewaschen und dieses Volumen mit der jeweiligen aufkonzentrierten LHCII-Lösung vereint. Die beiden LHCII-Proben werden schließlich mit LM-Puffer auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt, entsprechend ihrem Ausgangsvolumen.

Für die Auswertung der LHCII/WSCP-Interaktion werden die beiden LHCII-Proben bezüglich ihrer Stabilität bzw. Intaktheit und bezüglich ihres Pigmentgehalts eingehend untersucht. Als Vergleich dient die Probe „t = 0“ der LHCII-Lösung.

Zur Überprüfung der Stabilität bzw. Intaktheit der LHCII-Komplexe nach der Inkubation mit WSCP (bei der Kontrolle: nach der Inkubation mit der Ni-Sepharose-Matrix) werden CD-Spektren sowie Fluoreszenzspektren gemessen, wie in 3.1.15.2.1 und 3.1.15.3 beschrieben. Es werden ebenfalls Tieftemperaturabsorptionsspektren gemessen, wie in 3.1.15.1.2 beschrieben. Mit diesen spektroskopischen Methoden können neben der Intaktheit der Pigment-Protein-Komplexe auch veränderte intramolekulare Pigment-Pigment-Wechselwirkungen beobachtet werden.

Die gebundenen Pigmente der LHCII-Proben vor und nach der Inkubation werden mittels analytischer HPLC untersucht und quantifiziert (s. 3.1.3.1), nach quantitativer Extraktion mit 2-Butanol (durchgeführt wie in Trostmann, 2004 (Diplomarbeit), beschrieben).

3.1.10.4 Interaktion zwischen WSCP und Chlorophyllase

Eine der für WSCP postulierten physiologischen Funktionen ist eine Rolle als Chl-Carrier beim Chl-Abbau. WSCP, als wasserlösliches, Chlorophyll-bindendes Protein, könnte dabei Chl-Moleküle zum ersten Enzym des Chl-Abbauges, der Chlorophyllase, transportieren (Satoh *et al.*, 1998). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit Interaktionsversuche mit WSCP und Chlorophyllase durchgeführt. Es wurden rekombinantes WSCP und native Chlorophyllase aus Roggen, sowie rekombinante Chlorophyllase aus Weizen (*Triticum aestivum*) und aus *Arabidopsis* für die Experimente eingesetzt.

Das Expressionsplasmid für rekombinante Chlorophyllase aus Weizen, pTaCHL, wurde freundlicherweise von Dr. Edgar Cahoon (s. Arkus *et al.*, 2005) zur Verfügung gestellt. Das Expressionsplasmid für rekombinante Chlorophyllase aus *Arabidopsis thaliana*, ATHCOR1, wurde freundlicherweise von Dr. Celso Benedetti (s. Benedetti und Arruda, 2002) zur

Verfügung gestellt. Sowohl pTaCHL als auch ATHCOR1 wurden für diese Arbeit in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen transformiert.

3.1.10.4.1 Überexpression und Aufreinigung rekombinanter Chlorophyllase aus Weizen

Das Expressionsplasmid besteht aus dem pET-28a-Vektor, welcher u.a. für eine Kanamycinresistenz und einen N-terminalen Hexahistidylrest codiert, und der einklonierten Chlorophyllase-cDNA (pTaCHL). Die Überexpression und Aufreinigung von pTaCHL erfolgen in Anlehnung an die in Arkus *et al.* (2005) beschriebene Methode, mit folgenden Änderungen: 1) es wird LB-Medium für die Bakterienanzucht verwendet (s. 3.2.1.1), 2) die Überexpression findet über Nacht statt, 3) der Zellaufbruch nach der Überexpression findet in der *French Press* statt (s. 3.1.5) und 4) der Hexahistidylrest wird nicht vom Protein entfernt.

Die Proteinkonzentration der aufgereinigten Chlorophyllase wird mit einem Bio-Rad Protein-Assay (Bio-Rad, München) nach Herstelleranleitung bestimmt. Die Reinheit der Proben wird mittels SDS-PAGE (s. 3.1.12.1) überprüft.

3.1.10.4.2 Überexpression und Aufreinigung rekombinanter Chlorophyllase aus Arabidopsis

Das Expressionsplasmid besteht aus dem pMAL-c2-Vektor (NEB, Schwalbach), welcher u.a. für eine Ampicillinresistenz sowie das *maltose-binding protein* (MBP) codiert, und der einklonierten Chlorophyllase-cDNA (ATHCOR1). Die Chlorophyllase wird als Fusionsprotein mit MBP exprimiert. Die Überexpression und Aufreinigung von ATHCOR1 werden durchgeführt wie in Benedetti und Arruda (2002) beschrieben. Der Zellaufbruch nach der Überexpression erfolgt in der *French Press* (s. 3.1.5). Die Proteinquantifizierung erfolgt mittels Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München) nach Herstellerangaben. Die Reinheit des Proteins wird mittels SDS-PAGE überprüft (s. 3.1.12.1).

3.1.10.4.3 Herstellung von Chlorophyllasepulver aus etiolierten Roggenkeimlingen

Native Chlorophyllase aus Roggen wird als Chlorophyllase-haltiges Pulver aus etiolierten Roggenkeimlingen extrahiert wie in Lion, 2005 (Dissertation), beschrieben.

3.1.10.4.4 Chlorophyllase-Assay

Material:

100 mM TrisHCl pH 7

Chlorophyllase

400 µg Chl (a/b = 1)

100% Aceton p.a.

Aceton:Hexan (1:1)

Um die Chlorophyllaseaktivität zu überprüfen, werden 2 ml 100 mM Tris HCl pH 7 mit 50 µg Chlorophyllase und 400 µg Chl (a/b = 1), welches in 1 ml 100% Aceton gelöst wurde, versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Min. bei RT werden davon 500 µl in 1 ml Aceton:Hexan (1:1) gegeben und somit die Reaktion gestoppt. Das Reaktionsgefäß wird gevortext und anschließend 2 Min. bei 14.000 Upm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Es bilden sich zwei Phasen: die untere Acetonphase, in der sich das Chlorophyllid befindet und die obere Hexanphase, mit noch nicht umgesetztem Chlorophyll. Als Kontrolle dient eine Probe, die vor der Chlorophyllasezugabe entnommen wurde.

3.1.10.4.5 Interaktionsversuch

Um den Interaktionsversuch mit Chlorophyllase und Chl-WSCP durchführen zu können wurden Medien gesucht, in denen WSCP stabil, Chlorophyllase aktiv und Chl löslich sind. Chl ist in Aceton löslich und nach Tanaka *et al.* (1982) ist Chlorophyllase in 30% Aceton sehr aktiv. In einem entsprechenden Kontrollansatz wurde überprüft, ob die Chl-WSCP-Probe unter diesen Versuchsbedingungen (s. Tab. 3-5, Ansatz a) bzw. b)) ebenfalls stabil ist. Des Weiteren wurde die WSCP-Stabilität in einer Lipid-/ Ethanollösung (s. Tab. 3-5, Ansatz c) bzw. d)) untersucht. Der Versuchsansatz in einer Lipid-/Ethanollösung wurde zusätzlich zu dem Ansatz in Aceton durchgeführt, um den *in vivo*-Verhältnissen näher zu kommen.

Material:

rekombinante Chlorophyllase aus Weizen (pTaCHL, s. 3.1.10.4.1)
rekombinante Chlorophyllase aus *Arabidopsis* (ATHCOR1, s. 3.1.10.4.2)
Chlorophyllaseextrakt aus etiolierten Roggenkeimlingen (s. 3.1.10.4.3)
Chl-(m)BoWSCP_{His} (s. 3.1.8; 2 mg/ml)
Elutionspuffer (s. 3.1.8.1)
50 mM TrisHCl pH 8
Phosphatidylglycerol (PG; 0,3 mg/ml)
100% Aceton (p.a.)
100% Ethanol (p.a.)
Chl *b* (getrocknet)
Imidazol (Feststoff)

Mit nativer Chlorophyllase

Drei gehäufte Spatelspitzen Chlorophyllasepulver (s. 3.1.10.4.3) werden in 2 ml 50 mM TrisHCl pH 8 gelöst (Ultraschall). 800 µl Chl-WSCP werden mit 800 µl Chlorophyllaselösung gemischt und bei 30-32°C unter ständigem Drehen und dunkel 5 St. inkubiert. Als Kontrolle für die Chlorophyllaseaktivität werden 90 µg Chl in 500 µl 100% Aceton gelöst und mit 0,3 M Imidazol (= 20 mg) versetzt, um die Versuchsbedingungen mit WSCP (Rekonstitution enthält 0,3 M Imidazol) zu simulieren. 10 µl der Chl-Lösung werden entnommen (Probe t=0) und mit 990 µl 80% Aceton versetzt; diese Probe kann direkt für die Analyse mittels analytischer HPLC (s.u.) eingesetzt werden. Zu der restlichen Chl-Lösung werden 500 µl Chlorophyllaselösung gegeben und unter denselben Bedingungen inkubiert wie der Versuchsansatz. Nach 60 und 180 Min. werden jeweils 100 µl der Kontrolle entnommen und mit 150 µl 100% Aceton versetzt, um die Reaktion zu stoppen.

Von allen Proben werden aus jeweils 100 µl die Pigmente mit 2-Butanol extrahiert (s. 3.1.9.1) und mittels analytischer HPLC untersucht (s. 3.1.3.1). Als WSCP-Probe $t=0$ werden 50 µl der Chl-WSCP-Probe 1:1 mit dH_2O verdünnt und daraus ebenfalls die Pigmente extrahiert und analysiert. Des Weiteren wird eine native PAGE durchgeführt (s. 3.1.12.2), sowohl mit Deriphatpuffer als auch mit detergensfreiem Puffer. Dabei wird das Laufverhalten der Chl-WSCP-Probe vor und nach Inkubation mit Chlorophyllase verglichen. Es werden 25 µl der Chl-WSCP-Probe und 50 µl des WSCP-Chlorophyllase-Ansatzes auf ein präparatives, 1,5 mm dickes, PAA-Gel aufgetragen. Im Anschluss an die Elektrophorese werden die grünen Banden ausgeschnitten und jeweils extrahiert und analysiert wie in 3.1.9.2 beschrieben. Zusätzlich werden die beiden Proben mittels SDS-PAGE (s. 3.1.12.1) analysiert.

Mit rekombinanter Chlorophyllase

Es werden vier verschiedene Ansätze erstellt und jeweils die entsprechende Kontrolle, wie in Tab. 3-5 angegeben. Die Kontrollansätze dienen dazu, die WSCP-Stabilität bzw. die Chlorophyllaseaktivität unter den gegebenen Versuchsbedingungen zu überprüfen. Die bei den Chlorophyllase-Kontrollansätzen eingesetzte Menge Chl entspricht der in den übrigen Ansätzen enthaltenen, WSCP-gebundenen, Chl-Menge.

Tab. 3-5: Pipettierschema für den Interaktionsversuch mit WSCP und Chlorophyllase. Die Ausgangskonzentration von Chl-WSCP beträgt 2 mg/ml, pTaCHL 0,5 mg/ml, ATHCOR1 1,6 mg/ml und PG 0,3 mg/ml.

	Ansatz	Chlorophyllase- Kontrolle	WSCP-Kontrolle
a)	100 µl Aceton 100 µl ATHCOR1 100 µl Chl-WSCP	4 µg Chl <i>b</i> in 100 µl Aceton 100 µl ATHCOR1 100 µl Elutionspuffer	100 µl Aceton 100 µl Elutionspuffer 100 µl Chl-WSCP
b)	100 µl Aceton 100 µl pTaCHL 100 µl Chl-WSCP	4 µg Chl <i>b</i> in 100 µl Aceton 100 µl pTaCHL 100 µl Elutionspuffer	/
c)	1 µl Ethanol 99 µl PG 100 µl ATHCOR1 100 µl Chl-WSCP	4 µg Chl <i>b</i> in 1 µl Ethanol 99 µl PG 100 µl ATHCOR1 100 µl Elutionspuffer	1 µl Ethanol 99 µl PG 100 µl Elutionspuffer 100 µl Chl-WSCP
d)	1 µl Ethanol 99 µl PG 100 µl pTaCHL 100 µl Chl-WSCP	4 µg Chl <i>b</i> in 1 µl Ethanol 99 µl PG 100 µl pTaCHL 100 µl Elutionspuffer	/

Die Zugabe der einzelnen Komponenten erfolgt jeweils unter Vortexen, in der Reihenfolge wie in Tab. 3-5 angegeben. Alle Ansätze werden bei 30°C für 2 St. im Dunkeln inkubiert und daraufhin 2 Min. bei 14000 Upm und RT zentrifugiert (Tischzentrifuge).

Von jedem Versuchsansatz sowie von jeder WSCP-Kontrolle wird ein CD-Spektrum im sichtbaren Wellenlängenbereich gemessen (s. 3.1.15.2.1), um zu sehen, ob sich an den

pigmentierten WSCP-Komplexen Änderungen hinsichtlich der Pigmentbindung ergeben haben. Von allen Proben werden 100 µl entnommen und hiervon eine quantitative Butanolextraktion der Pigmente durchgeführt (s. 3.1.9.1.2), und die extrahierten Pigmente mittels analytischer HPLC untersucht (s. 3.1.3.1). Hierdurch lässt sich erkennen, ob Chl zu Chlid umgesetzt wurde.

Zur weiteren Analyse wird eine detergensfreie native PAGE durchgeführt (s. 3.1.12.2). Dazu wird ein präparatives, 1,5 mm dickes, PAA-Gel mit je 100 µl Versuchsansatz beladen, sowie ein analytisches, 0,75 mm dickes, PAA-Gel mit je 11 µl Versuchsansatz beladen. Aus dem präparativen Gel werden im Anschluss an die Elektrophorese die grünen Banden ausgeschnitten und jeweils extrahiert und analysiert wie in 3.1.9.2 beschrieben. Das analytische Gel wird mit Coomassie gefärbt (s. 3.1.12.3), um die Proteine sichtbar zu machen.

3.1.10.5 Enzyminhibitions-Assays

Da Klasse-II-WSCPs in ihrer Aminosäuresequenz eine Homologie zu Kunitz-Proteaseinhibitoren aufweisen, wäre eine solche Funktion auch für sie denkbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher verschiedene Enzyminhibitions-Assays mit rekombinantem Blumenkohl-WSCP durchgeführt. Dabei wurde sowohl das pigmentierte als auch das unpigmentierte Protein auf mögliche inhibierende Eigenschaften untersucht, um gleichzeitig der Frage nachzugehen, ob die geringe Pigmentierung des WSCP möglicherweise in diesem Zusammenhang einer regulatorischen Funktion dient.

3.1.10.5.1 Trypsin-Assay mit Azocasein

Azocasein ist ein unspezifisches Substrat für Proteasen. Bei seiner Hydrolyse setzt es einen Azofarbstoff frei, dessen Entstehung bei 440 nm gemessen werden kann.

Der Trypsin-Assay mit Azocasein wurde wie in Gallagher *et al.* (1986) beschrieben durchgeführt, mit folgenden Modifikationen: a) es erfolgte *keine* Inkubationszeit von Trypsin mit WSCP, b) die Reaktionszeit betrug insgesamt nur 30 Min. und c) das Endvolumen der einzelnen Proben betrug 1 ml.

Es wurde ein 5-fach molarer Überschuss von WSCP zu Trypsin eingesetzt ($MW_{(\text{Trypsin})} = 23.300 \text{ Da}$; $MW_{(\text{mBoWSCPhis})} = 21.734 \text{ Da}$).

Material:

Azocasein (Sigma-Aldrich; 10 mg/ml, gelöst in ddH₂O)
 Trypsin (Roche Diagnostics; 80 µg/ml, gelöst in ddH₂O)
 Hagihara Protein Precipitant (HPP) [0,3 M CH₃COO⁻; 1 M TCA; 2 M NaOAc]
 0,3 M TrisHCl pH 8,3
 10 M NaOH
 ddH₂O
 Elutionspuffer (s. 3.1.8.1)
 Apo-mBoWSCPhis (s. 3.1.6.1) bzw. Chl-mBoWSCPhis (s. 3.1.8.1) (1,2 mg/ml)

Der Versuch wird sowohl mit WSCP-Apoprotein, als auch mit pigmentiertem WSCP durchgeführt. Jeder Versuchsansatz wird für 8 Messproben berechnet ($t = 0, 5, 10, 15, 20, 25$ und 30 Min., plus 1 Reserve). Zum stoppen der Reaktion werden Reaktionsgefäße mit je $37 \mu\text{l}$ Hagihara Protein Precipitant (HPP) vorbereitet, die auf Eis gehalten werden. Für die photometrische Messung wird auch pro Probe ein Reaktionsgefäß mit $33 \mu\text{l}$ 10 M NaOH vorbereitet.

In der folgenden Tabelle ist der Reaktionsansatz für eine *einzelne* Messprobe aufgeführt. Als Aktivitätskontrolle für Trypsin wird zusätzlich ein Versuchsansatz mit Elutionspuffer anstelle von WSCP erstellt. Als weitere Kontrolle kann noch eine Probe mit Soybean Trypsin Inhibitor (STI) anstelle von WSCP angesetzt werden.

Tab. 3-6: Reaktionsansatz für den Trypsin-Assay mit Azocasein. Die Angaben gelten für eine *einzelne* Messprobe. Das Gesamtvolumen beträgt $334 \mu\text{l}$.

Reagenz	Volumen (μl)
TrisHCl pH 8 (0,3 M)	110
ddH ₂ O	24
Trypsin (80 $\mu\text{g/ml}$)	100
WSCP (1,2 mg/ml)	33
Azocasein (10 mg/ml)	67

Die Reaktion erfolgt bei Raumtemperatur. Für jeden Gesamtreaktionsansatz (8 Messproben, s.o.) werden erst einmal nur die benötigten Mengen Puffer, Wasser und Trypsin zusammenpipettiert. Für die Probe $t = 0$ werden aus diesem Reaktionsansatz $234 \mu\text{l}$ entnommen, zu den vorbereiteten $37 \mu\text{l}$ HPP auf Eis gegeben und dann erst WSCP sowie Azocasein zu dieser Probe gegeben. Mit dieser Probe wird weiter verfahren wie unten beschrieben.

Zu dem restlichen Reaktionsansatz werden die entsprechend benötigten Mengen WSCP und Azocasein – die direkt vorher miteinander vermischt wurden – gegeben. Sofort nach dem Mischen wird die Zeitmessung gestartet. Zu gegebenen Zeitpunkten (s.o.) werden jeweils $334 \mu\text{l}$ aus dem Reaktionsansatz entnommen und zu den vorbereiteten $37 \mu\text{l}$ HPP auf Eis gegeben, um die Reaktion zu stoppen. Die Probe wird 10 Min. auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (5 Min., 4°C , 14000 UpM , Rotor 1195, Hettich). $167 \mu\text{l}$ Überstand werden zu den vorbereiteten $33 \mu\text{l}$ 10 M NaOH gegeben, gemischt und abschließend noch mit $800 \mu\text{l}$ ddH₂O versetzt, sodass das Endvolumen der Probe 1 ml beträgt. Nun kann die Absorption bei 440 nm gemessen werden. Als Referenzlösung für die photometrische Messung dient eine „blank“-Probe, bei der die Volumina Trypsin und Azocasein durch dH₂O ersetzt wurden und das Volumen WSCP durch Elutionspuffer ersetzt wurde, die aber ansonsten wie alle anderen Proben behandelt wurde.

3.1.10.5.2 Trypsin-Assay mit L-BAPNA

Um den Trypsin-Assay bei einem niedrigeren pH-Wert auszuführen wurde das Substrat N(α)-Benzoyl-L-Arginin-4-Nitroanilid Hydrochlorid (L-BAPNA) eingesetzt, welches bei pH 5,5 löslich ist, im Gegensatz zum Trypsinsubstrat Azocasein. Bei der Hydrolyse von L-BAPNA wird das Chromophor p-Nitroanilin freigesetzt, welches bei 410 nm detektiert werden kann.

Es wurde ein 5-fach molarer Überschuss von WSCP zu Trypsin eingesetzt ($MW_{(\text{Trypsin})} = 23.300 \text{ Da}$; $MW_{(\text{mBoWSCPhis})} = 21.734 \text{ Da}$).

Material:

L-BAPNA (Sigma-Aldrich; 15 mM, gelöst in DMSO)
 Trypsin (Roche Diagnostics; 111 $\mu\text{g/ml}$, gelöst in ddH₂O)
 0,2 M NaOAc pH 5,5
 50% (w/v) Trichloressigsäure (TCA)
 ddH₂O
 Elutionspuffer (s. 3.1.8.1)
 Apo-BoWSCPhis (s. 3.1.6.1) bzw. Chl-BoWSCPhis (s. 3.1.8.1) (6,4 mg/ml)

Der Versuch wird sowohl mit WSCP-Apoprotein, als auch mit pigmentiertem WSCP durchgeführt. Jeder Versuchsansatz wird für 6 Messproben berechnet (t = 0, 10, 20, 30 und 60 Min., plus 1 Reserve). Zum stoppen der Reaktion werden Reaktionsgefäße mit je 100 μl 50% TCA vorbereitet, die auf Eis gehalten werden.

In der folgenden Tabelle ist der Reaktionsansatz für eine *einzelne* Messprobe aufgeführt. Als Aktivitätskontrolle für Trypsin wird zusätzlich ein Versuchsansatz mit Elutionspuffer anstelle von WSCP erstellt. Als weitere Kontrolle kann noch eine Probe mit Soybean Trypsin Inhibitor (STI) anstelle von WSCP angesetzt werden.

Tab. 3-7: Reaktionsansatz für den Trypsin-Assay mit L-BAPNA. Die Angaben gelten für eine *einzelne* Messprobe. Das Gesamtvolumen beträgt 1 ml.

Reagenz	Volumen (μl)
NaOAc pH 5,5 (0,2 M)	500
ddH ₂ O	358
Trypsin (111 $\mu\text{g/ml}$)	100
WSCP (6,4 mg/ml)	8,5
L-BAPNA (15 mM)	33,5

Für jeden Gesamtreaktionsansatz (6 Messproben, s.o.) werden erst einmal nur die benötigten Mengen Puffer, Wasser und Trypsin zusammenpipettiert und 5 Min. bei 37°C inkubiert. Dann werden die entsprechenden Mengen WSCP und L-BAPNA zugegeben, der Ansatz gut gemischt und sofort die Zeitmessung gestartet. Der Reaktionsansatz wird weiter bei 37°C inkubiert.

Zu gegebenen Zeitpunkten (s.o.) werden jeweils 900 µl aus dem Reaktionsansatz entnommen und zu den vorbereiteten 100 µl 50% TCA auf Eis gegeben, um die Reaktion zu stoppen. Die Probe wird mindestens 45 Min. auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (10 Min., 3°C, 15000 UpM, Rotor 1195, Hettich). Der Überstand wird in eine schmale Küvette (1 ml Volumen, d = 1 cm) pipettiert und die Absorption bei 410 nm gemessen. Als Referenzlösung für die photometrische Messung dient eine „blank“-Probe, bei der das Volumen Trypsin durch dH₂O ersetzt, das Volumen WSCP durch Elutionspuffer ersetzt und das Volumen L-BAPNA durch DMSO ersetzt wurde, die aber ansonsten wie alle anderen Proben behandelt wurde.

3.1.10.5.3 Papain-Assay

Halls *et al.* (2006) beobachteten, dass rekombinantes *Arabidopsis*-WSCP sowie ein WSCP aus Blumenkohlinfloreszenz die Cysteinprotease Papain bei pH 4,5 inhibieren, nicht jedoch bei pH 6,3. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob auch das rekombinante Blumenkohl-WSCP (aus Blättern) in der Lage ist, Papain bei pH 4,5 zu inhibieren. Als Substrat wurde L-BAPNA (s. 3.1.10.5.2) verwendet.

Es wurde ein 5-fach molarer Überschuss von WSCP zu Papain eingesetzt ($MW_{(\text{Papain})} = 23.406 \text{ Da}$; $MW_{(\text{mBoWSCPhis})} = 21.734 \text{ Da}$).

Material:

L-BAPNA (Sigma-Aldrich; 15 mM, gelöst in DMSO)
 Papain (Sigma-Aldrich ; 0,2 mg/ml, gelöst in ddH₂O)
 0,2 M NaOAc pH 4,5
 1 M L-Cystein
 0,1 M DTT
 50 mM EDTA
 5% (w/v) CHAPS
 50% (w/v) TCA
 ddH₂O
 Elutionspuffer (s. 3.1.8.1)
 Apo-(m)BoWSCPhis (s. 3.1.6.1) bzw. Chl-(m)BoWSCPhis (s. 3.1.8.1)

Der Versuch wird sowohl mit Vollängen-WSCP (BoWSCPhis) als auch mit dem C-terminal verkürzten Protein (mBoWSCPhis) durchgeführt, jeweils mit dem Apoprotein sowie mit dem pigmentierten Protein. Jeder Versuchsansatz wird für 6 Messproben berechnet (t = 0, 10, 20, 30 und 60 Min., plus 1 Reserve). Zum stoppen der Reaktion werden Reaktionsgefäße mit je 100 µl 50% TCA vorbereitet, die auf Eis gehalten werden.

In der folgenden Tabelle ist der Reaktionsansatz für eine *einzelne* Messprobe aufgeführt. Als Aktivitätskontrolle für Papain wird zusätzlich ein Versuchsansatz mit Elutionspuffer anstelle von WSCP erstellt. Als weitere Kontrolle kann noch eine Probe mit dem Papaininhibitor Leupeptin anstelle von WSCP angesetzt werden.

Tab. 3-8: Reaktionsansatz für den Papain-Assay mit L-BAPNA. Das benötigte WSCP-Volumen für einen 5-fach molaren Überschuss zu Papain wird entsprechend der Konzentration der WSCP-Probe berechnet. Daraus ergibt sich das benötigte Volumen ddH₂O. Das Gesamtvolumen beträgt 1 ml.

Reagenz	Volumen (µl)
NaOAc pH 4,5 (0,2 M)	500
L-Cystein (1 M)	5
DTT (0,1 M)	10
EDTA (50 mM)	2
CHAPS (5% w/v)	20
ddH ₂ O	x
Papain (0,2 mg/ml)	55,6
WSCP	y
L-BAPNA (15 mM)	33,4

Für jeden Gesamtreaktionsansatz (6 Messproben, s.o.) werden erst einmal alle Komponenten außer WSCP und L-BAPNA zusammenpipettiert und 30 Min. bei 37°C inkubiert, um das Papain zu aktivieren. Dann werden die entsprechenden Mengen WSCP und L-BAPNA zugegeben, der Ansatz gut gemischt und sofort die Zeitmessung gestartet. Der Reaktionsansatz wird weiter bei 37°C inkubiert.

Der weitere Versuchsablauf entspricht dem Trypsin-Assay mit L-BAPNA (s. 3.1.10.5.2).

3.1.10.5.4 Myrosinase-Assay

WSCP wird in *Lepidium virginicum* hauptsächlich in den sogenannten Myrosinzellen exprimiert (persönliche Mitteilung von Prof. Hiroyuki Satoh, Japan), welche bei der Abwehrreaktion gegen Fraßfeinde eine Rolle spielen. Um zu überprüfen, ob WSCP ein Interaktionspartner von Myrosinase ist und eventuell eine Funktion als Myrosinasehemmer besitzt, wurde ein Myrosinase-Assay mit rekombinantem WSCP durchgeführt.

Es wurde ein 2-fach molarer Überschuss von WSCP zu Myrosinase eingesetzt ($MW_{(Myrosinase)} = 60.000 \text{ Da}$; $MW_{(BoWSCP_{His})} = 22.987 \text{ Da}$). Die verwendete Myrosinase (Sigma, isoliert aus *Sinapis alba*) besaß eine Konzentration von 193 U/g.

Vorversuch: pH-Abhängigkeit der Myrosinaseaktivität

Material:

50 mM NaP pH 4, 5, 6, 7 und 8

ddH₂O

10 mM Sinigrin (Sigma-Aldrich; gelöst in ddH₂O)

Myrosinase (Sigma-Aldrich; zu 0,2 U/ml gelöst in ddH₂O)

Es wird der Sinigrinabbau bei 227 nm verfolgt. Gemessen wird in Quarz-Mikroküvetten (Küvettenvolumen: 500 µl). 660 µl NaP werden mit 280 µl ddH₂O gemischt und davon 890 µl auf zwei Küvetten (je 445 µl) aufgeteilt, die im Zweistrahlphotometer aufeinander adjustiert werden. Zur hinteren Küvette (Referenz) werden 5 µl ddH₂O zugefügt, zur vorderen Küvette 5 µl Sinigrin. Zum Mischen werden die Küvetten mit einem Deckel verschlossen und invertiert. Die Sinigrinabsorption wird bei 227 nm gemessen und anschließend der hinteren Küvette 50 µl ddH₂O zugefügt, der vorderen Küvette 50 µl Myrosinase und wieder durch Invertieren gemischt. Das Gesamtvolumen beträgt 500 µl. Der Sinigrinabbau wird als Abnahme der Absorption bei 227 nm 15 Min. lang verfolgt.

Über das Lambert-Beersche Gesetz ($E = \epsilon \cdot c \cdot d$) kann der Sinigrinabbau in mol/l über die Zeit berechnet werden. Der molare Extinktionskoeffizient von Sinigrin bei 227 nm beträgt 6784 M⁻¹ cm⁻¹ (Palmieri *et al.*, 1982).

Myrosinase-Assay: Monitoring der Enzymaktivität mittels UV-Messung

Das bei diesem Assay verwendete WSCP wurde bei seiner Rekonstitution an der Ni-Säule (s. 3.1.8.1) über einen niedrigen pH-Wert/hohe Salzkonzentration (20 mM NaP pH 3 / 0,5 M NaCl) anstelle von Imidazol von der Säule eluiert, da Imidazol selbst im UV-Bereich absorbiert und somit bei der Messung bei 227 nm stören würde. Anschließend wurde das Eluat mittels Ultrafiltration in einem Amicon Ultra-4 Filter (30 kDa MWCO, Millipore) auf 750 µl eingengt und unter Vortexen 45 µl 20 mM Na₂HPO₄ zugesetzt, um den pH-Wert auf 5 zu erhöhen für den Assay.

Material:

50 mM NaP pH 5

ddH₂O

10 mM Sinigrin (Sigma-Aldrich; gelöst in ddH₂O)

Myrosinase (Sigma-Aldrich; zu 0,8 U/ml bzw. 4,16 mg/ml gelöst in ddH₂O)

Apo-BoWSCP_{His} (s. 3.1.6.1) bzw. Chl-BoWSCP_{His} (s. 3.1.8.1)

Elutionspuffer pH 3 [20 mM NaP pH 3; 0,5 M NaCl]

Der Versuch wird sowohl mit WSCP-Apoprotein, als auch mit pigmentiertem WSCP durchgeführt. In der folgenden Tabelle ist der Reaktionsansatz für den Myrosinase-Assay aufgeführt. Für die Referenzprobe werden die Volumina Sinigrin und Myrosinase durch die entsprechenden Volumina ddH₂O ersetzt, sowie das Volumen WSCP durch das entsprechende Volumen Elutionspuffer pH 3 ersetzt.

Tab. 3-9: Reaktionsansatz für den Myrosinase-Assay. Das benötigte WSCP-Volumen für einen 2-fach molaren Überschuss zu Myrosinase wird entsprechend der Konzentration der WSCP-Probe berechnet. Daraus ergibt sich das benötigte Volumen ddH₂O. Das Gesamtvolumen beträgt 500 µl.

Reagenz	Volumen (µl)
NaP pH 5 (50 mM)	330
ddH ₂ O	x
Sinigrin (10 mM)	5
WSCP	y
Myrosinase (0,8 U/ml)	12,5

In zwei Quarz-Mikroküvetten (Volumen: 500 µl) werden je 330 µl NaP pipettiert. Dann werden die jeweils benötigten Volumina ddH₂O zugegeben und durch Invertieren gemischt. Die Referenzküvette kommt in den hinteren Strahlengang, die Probenküvette in den vorderen und sie werden bei 227 nm aufeinander adjustiert. In die Probenküvette wird die benötigte Menge WSCP gegeben, in die Referenzküvette die entsprechende Menge Elutionspuffer, und wieder durch Invertieren gemischt. Die Absorption des WSCP bei 227 nm wird überprüft – sie sollte < 1 sein. In die Probenküvette werden nun 5 µl Sinigrin gegeben, wieder invertiert und die Absorption bei 227 nm erneut überprüft (t = 0). Sie sollte nun < 2 sein, damit der Assay noch im linearen Bereich des Photometers (Jasco V-550) stattfindet. Zur Probenküvette werden schließlich 12,5 µl Myrosinase gegeben, rasch invertiert und die Zeitmessung sofort gestartet. Der Sinigrinabbau wird 30 Min. lang durch Abnahme der Absorption bei 227 nm beobachtet.

Über das Lambert-Beersche Gesetz ($E = \epsilon \cdot c \cdot d$) kann der Sinigrinabbau in mol/l über die Zeit berechnet werden. Der molare Extinktionskoeffizient von Sinigrin bei 227 nm beträgt 6784 M⁻¹ cm⁻¹ (Palmieri *et al.*, 1982).

Myrosinase-Assay: Monitoring der Enzymaktivität mittels „coupled enzyme assay“

Eine andere Möglichkeit, die Enzymaktivität der Myrosinase zu messen, ist über eine gekoppelte enzymatische Reaktion, oder „*coupled enzyme assay*“. Bei dieser Assayform wird die Glucose, die bei der Umsetzung des Sinigrins durch die Myrosinase gebildet wird, quantifiziert. Dabei wird die Glucose durch das Enzym Glucose-Oxidase zu Gluconsäure und H₂O₂ oxidiert. Das Enzym Peroxidase katalysiert anschließend die Reaktion von H₂O₂ mit dem Reagenz o-Dianisidin, wobei aus dem reduzierten, farblosen o-Dianisidin das braune, oxidierte o-Dianisidin entsteht. Dieses reagiert schließlich mit H₂SO₄ zu einem rosafarbenen, stabilen Produkt, welches bei 540 nm quantifiziert werden kann. Die Intensität der Farbe ist dabei proportional zu der ursprünglichen Glucosekonzentration.

Material:*für Myrosinase-Assay:*

50 mM NaP pH 5

ddH₂O10 mM Sinigrin (Sigma-Aldrich; gelöst in ddH₂O)Myrosinase (Sigma-Aldrich; zu 0,4 U/ml bzw. 2,08 mg/ml gelöst in ddH₂O)

Apo-(m)BoWSCPhis (s. 3.1.6.1) bzw. Chl-(m)BoWSCPhis (s. 3.1.8.1)

Elutionspuffer (s. 3.1.8.1)

für Glucosenachweis:

Probe aus Myrosinase-Assay

H₂SO₄ (12 N)

GAGO-Kit (Sigma-Aldrich)

Der Versuch wird sowohl mit Vollängen-WSCP (BoWSCPhis) als auch mit dem C-terminal verkürzten Protein (mBoWSCPhis) durchgeführt, jeweils mit dem Apoprotein sowie mit dem pigmentierten Protein. In der folgenden Tabelle ist der Reaktionsansatz für den Myrosinase-Assay aufgeführt, ausreichend für 7 Messproben (t = 0, 2, 4, 6, 8, 10 und 15 Min., plus eine halbe Probe Reserve).

Tab. 3-10: Reaktionsansatz für den Myrosinase-Assay mit anschließendem „coupled enzyme assay“. Das benötigte WSCP-Volumen für den gewünschten molaren Überschuss zu Myrosinase wird entsprechend der Konzentration der WSCP-Probe berechnet. Daraus ergibt sich das benötigte Volumen ddH₂O. Das Gesamtvolumen beträgt 1424 µl. Die Myrosinase wird in einem späteren Schritt zugegeben (s. Text).

Reagenz	Volumen (µl)
NaP pH 5 (50 mM)	990
ddH ₂ O	x
Sinigrin (10 mM)	15
WSCP	y

Der Ansatz (noch ohne Myrosinase!) wird 5 Min. bei 37°C im Wasserbad äquilibriert. Für t=0 werden 10,1 µl Myrosinase 8 Min. bei 100°C im Wasserbad gekocht (Reaktionsgefäß fest mit einer Klemme verschließen, damit der Deckel nicht aufspringt!) und das Enzym somit inaktiviert. Anschließend werden 189,9 µl aus dem Reaktionsansatz (s. Tab. 3-10) entnommen, mit der inaktivierten Myrosinase gemischt (Gesamtvolumen: 200 µl) und weitere 5 Min. gekocht. Zum restlichen Reaktionsansatz (1234,1 µl) werden 65,9 µl Myrosinase pipettiert (Gesamtvolumen: 1300 µl), gemischt und rasch auf 6 Reaktionsgefäße à 200 µl aufgeteilt. Diese werden fest mit einer Klemme verschlossen und weiter bei 37°C inkubiert. Zum gegebenen Zeitpunkt (s.o.) wird je eine 200 µl-Probe 8 Min. im Wasserbad gekocht und so die Myrosinasereaktion gestoppt.

Für die Bestimmung der Myrosinaseaktivität über die Glucosekonzentration werden alle gekochten Proben abzentrifugiert (10 Min., 4°C, 15000 Upm, Rotor 1195, Hettich) und 180 µl des Überstandes zur Glucosebestimmung mittels GAGO-Assay-Kit (Sigma) verwendet. Der GAGO-Assay erfolgt gemäß der Anleitung des Herstellers; die Volumina der verwendeten Kit-Reagenzien werden auf das Probenvolumen von 180 µl angepasst (die Angaben im Kit gelten für ein Probenvolumen von 1 ml). Nach Zufügen aller Kit-Reagenzien beträgt das Endvolumen jeder Messprobe somit 900 µl.

Hinweis:

In Verlauf dieser Arbeit hat sich herausgestellt, dass der Glucosenachweis mittels „*coupled enzyme assay*“ nicht für Chl-WSCP-Proben, wie sie in dieser Arbeit hergestellt wurden, geeignet ist! Nähere information hierzu s. 4.2.4.3.3 und 4.2.4.4.

3.1.10.6 Glucosebindungstest mit Chl-WSCP

Um zu untersuchen, ob Chl-WSCP Glucose binden kann, wurde der Pigment-Protein-Komplex mit Glucose inkubiert und anschließend das WSCP wieder aus dem Versuchsansatz entfernt. Mit Hilfe des GAGO-Kits (Sigma, s. 3.1.10.5.4) wurde schließlich bestimmt, wie viel Glucose noch in dem Reaktionsansatz vorhanden ist, im Vergleich zu Kontrollproben.

Material:

Elutionspuffer (EP) (s. 3.1.8.1)
 50 mM NaP pH 5
 ddH₂O
 Glucoselösung (0,2 mg/ml)
 Apo-(m)BoWSCP_{his} (s. 3.1.6.1) bzw. Chl-(m)BoWSCP_{his} (s. 3.1.8.1)
 GAGO-Kit (Sigma-Aldrich)
 Amicon Ultra-4 Filter (30 kDa MWCO; Millipore)

In der nachfolgenden Tabelle ist der Reaktionsansatz aufgeführt:

Tab. 3-11: Reaktionsansatz für den Glucosebindungstest mit WSCP. Es werden $6,1 \cdot 10^{-9}$ mol WSCP eingesetzt. WSCP wird mit EP auf die richtige Konzentration verdünnt. Bei der Kontrollprobe wird EP anstelle von WSCP eingesetzt. Das Gesamtvolumen beträgt 360 µl.

Reagenz	Volumen (µl)
NaP pH 5 (50 mM)	237,6
ddH ₂ O	79
Glucoselösung (0,2 mg/ml)	15,8
WSCP bzw. EP	27,6

Jeder Reaktionsansatz (mit Apo-WSCP, Chl-WSCP bzw. mit EP) wird doppelt angesetzt. Die Reaktionsansätze werden 1,5 Stunden bei RT inkubiert. Jeweils einer der entsprechenden Reaktionsansätze wird 8 Min. bei 100°C im Wasserbad gekocht, um die Bedingungen des Myrosinase-Assays zu simulieren (vgl. 3.1.10.5.4). Anschließend wird das WSCP aus den Reaktionsansätzen entfernt durch Ultrafiltration in Amicon Ultra-4 Filtern (30 kDa MWCO, Millipore) – mit der Kontrollprobe wird ebenso verfahren. Dazu werden die Proben in den Amicon-Filtern zentrifugiert (RT, 6000 UpM, Rotor 1015, Hettich), bis mindestens 200 µl

Probe durchgelaufen sind (ca. 10-20 Min.). Von dem Durchfluss werden 180 µl für den Glucosenachweis mit dem GAGO-Kit (Sigma) verwendet (s. 3.1.10.5.4).

Um die Zeitabhängigkeit der Reaktion zwischen Glucose und WSCP zu überprüfen wird der in Tab. 3-11 angegebene Reaktionsansatz in 5-facher Menge angesetzt und bei RT inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten (t = 0, 5, 10, 30 und 60 Min.) werden 300 µl aus dem Reaktionsansatz entnommen und wie oben beschrieben das WSCP über Ultrafiltration entfernt. Von dem Durchfluss werden 180 µl für den Glucosenachweis mit dem GAGO-Kit (Sigma) verwendet (s. 3.1.10.5.4).

3.1.11 Proteinextraktion aus *Arabidopsis thaliana*

Die Proteinextraktion aus verschiedenen Pflanzenorganen von *Arabidopsis thaliana* erfolgte nach der schnellen Extraktionsmethode von Martínez-García *et al.* (1999), bei der ein Totalproteinextrakt hergestellt wird. Die so extrahierten Proteine eignen sich u.a. für Western-Blot-Analyse und sind aufgrund der Pufferzusammensetzung (niedrige SDS-Konzentration, Na₂S₂O₅ als Reduktionsmittel) kompatibel mit kommerziellen Proteinquantifizierungs-Kits. Die Methode wurde in dieser Arbeit dahingehend modifiziert, dass die Proteine zur weiteren Aufreinigung anschließend einem Fällungsschritt unterzogen wurden.

Material:

Puffer E [125 mM TrisHCl pH 8,8; 1% (w/v) SDS; 10% (w/v) Glycerin; 50 mM Na₂S₂O₅]
50% (w/v) Trichloressigsäure (TCA)
100% Aceton, p.a. (auf -20°C gekühlt)

Das Pflanzenmaterial wird in einem Reaktionsgefäß mit 200 µl Puffer E pro 100 mg Frischgewicht versetzt und mit einem Stößel zerrieben. Härteres Pflanzenmaterial (z.B. Schoten) wird zusätzlich mit einer Spatelspitze Sand versetzt, damit es gründlicher zerkleinert werden kann. Samenproben werden in einem Porzellanmörser mit Porzellanpistill und unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zermörsert. Erst nach der Zerkleinerung und dem Wiederaufwärmen der Samenprobe wird Puffer E dazugegeben.

Nach dem Zerstoßen der Probe werden noch einmal 100 µl Puffer E zugegeben, um den Stößel abzuwaschen. Anschließend wird die Probe zentrifugiert (5 Min., 15°C, 19000 x g), um Zellfragmente abzutrennen. Der Überstand wird in ein frisches Reaktionsgefäß pipettiert, das Pellet noch mal mit 100 µl Puffer E versetzt und erneut zerstoßen und zentrifugiert wie oben beschrieben. Der Überstand wird mit dem Überstand der ersten Zentrifugation vereint – dies ist der Gesamtproteinextrakt. Das Pellet wird verworfen.

Für die Proteinfällung wird die Probe mit ¼ Probenvolumen 50% (w/v) TCA versetzt, sodass die Endkonzentration an TCA bei 10% liegt. Die Fällung erfolgt für mindestens 2 Stunden bei -20°C. Die gefällten Proteine werden abzentrifugiert (5 Min., 4°C, 16000 Upm, Rotor 1195, Hettich) und der Überstand verworfen. Das Pellet wird dreimal in kaltem (-20°C) Aceton resuspendiert (Ultraschall) und wieder abzentrifugiert. Danach wird das Proteinpellet bei

Raumtemperatur getrocknet und schließlich in 1 µl Puffer E pro mg eingesetztem Frischgewicht gelöst (Ultraschall!).

Die Proteinkonzentration kann mit dem Bio-Rad DC Protein Assay Kit bestimmt werden (s. Herstelleranleitung). Aufgrund des geringen Probenvolumens werden für die Proteinbestimmung nur 5 µl Probe verwendet und diese 1:10 mit dH₂O verdünnt; entsprechend wird eine 1:10-Verdünnung von Puffer E als Referenz angesetzt. Für das Protein Assay Kit werden 20 µl der Verdünnung verwendet, sodass die Probe nach Zugabe der Assay-Reagenzien ein Gesamtvolumen von 920 µl besitzt. Die BSA-Stammlösung für die Eichkurve wird in 1:10-verdünntem Puffer E angesetzt.

3.1.12 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Elektrophorese von Proteinen in Polyacrylamidgelen (PAA-Gelen) ist eine gängige Methode zur Auftrennung und Molekulargewichtsbestimmung von Proteingemischen. Das Molekularsieb entsteht dabei durch die Copolymerisation von Acrylamidmonomeren mit dem Vernetzer Bisacrylamid zu einem klaren Gel. Die Porenweite des Gels wird durch die Gesamtkonzentration an Acrylamid und dem Verhältnis Acrylamid:Bisacrylamid bestimmt.

Für diese Arbeit wurden für analytische Zwecke Gele mit einer Dicke von 0,75 mm verwendet und für präparative Zwecke Gele mit einer Dicke von 1,5 mm. Alle verwendeten Gele waren aus einem Sammelgel (4,5% PAA) und einem Trenngel (8%,10% oder 15% PAA) zusammengesetzt, welche unterschiedliche pH-Werte besitzen. Das Sammelgel (pH 6,8) dient der Fokussierung der Probe in einer scharfen Bande, während die eigentliche Auftrennung der Proteine im Trenngel (pH 8,8) stattfindet.

Material:

30% Acrylamid/1% Bisacrylamid
 1 M Tris/HCl (pH 8,8)
 1 M Tris/HCl (pH 6,8)
 80% (w/v) Glycerin
 dH₂O
 10% (w/v) APS
 TEMED

Midget-Gelkammersystem (Pharmacia, Schweden)
 Glas- und Aluminiumoxidplatten
 Spacer u. Kämmen mit 0,75 mm bzw 1,5 mm Stärke
 Saugflasche und Wasserstrahlpumpe
 100% Ethanol (techn.)

Die Gele werden nach folgendem Pipettierschema hergestellt; die angegebenen Mengen reichen aus für 10-11 Mini-Gele mit 0,75 mm Dicke, bzw. für ca. 6 Gele mit 1,5 mm Dicke:

Tab. 3-12: Pipettierschema für Polyacrylamidgele.

Reagenz	<u>Trenngel</u>			Sammelgel 4,5% PAA
	8% PAA	10% PAA	15% PAA	
dH ₂ O	14,6 ml	11,2 ml	1,8 ml	23,4 ml
1 M Tris/HCl pH 8,8	22,6 ml	22,6 ml	22,6 ml	–
1 M Tris/HCl pH 6,8	–	–	–	5,2 ml
80% (w/v) Glycerin	3,4 ml	3,4 ml	3,4 ml	5,0 ml
30% Acryamid / 1% Bisacrylamid	14,6 ml	18,0 ml	27,4 ml	6,0 ml
<i>Lösungen vor Zugabe von APS und TEMED entgasen!</i>				
10% (w/v) APS	400 µl	400 µl	400 µl	200 µl
TEMED	26 µl	26 µl	26 µl	20 µl

Zur Herstellung der Gele werden zunächst alle Bestandteile gemäß Tab. 3-12 für das entsprechende Trenngel *außer* dem APS und dem TEMED in eine Saugflasche pipettiert. Danach folgt das Entgasen der Lösung mit Wasserstrahlvakuum. Während des Entgasens der Trenngellösung wird das Midget-Gelkammersystem mit Glasplatten, Spacern und Aluminiumplatten zusammengesetzt und vorbereitet (genaue Beschreibung s. Herstellerangaben). Nach dem Entgasen der Lösung wird kurz vor dem eigentlichen Gießvorgang das APS und danach das TEMED zugesetzt. Dabei überträgt APS (Ammoniumpersulfat) als Radikalstarter nach Zerfall seinen Radikalcharakter auf TEMED (Tetraethylmethyldiamin), welches wiederum als Startradikal einer PAA-Kette fungiert. Nach der Zugabe dieser Chemikalien wird kurz gemischt und sofort zügig bis ca. 3 cm unter den Rand der Gelgießapparatur (Markierung!) gegossen. Anschließend werden alle Trenngele vorsichtig mit 200 µl dH₂O überschichtet, da Sauerstoff die Polymerisation stört. Nach etwa einer Stunde ist das Trenngel auspolymerisiert und das Wasser wird mit Filterpapier abgesaugt. Zu der entgasten Sammelgellösung werden APS und TEMED gegeben, kurz gemischt und die Lösung rasch auf das Trenngel gegossen. Die Probenkämme (mit 10 oder 15 Taschen) müssen schnell in das Sammelgel eingesetzt werden, bevor die Polymerisation zu sehr fortgeschritten ist.

Nach ca. einer Stunde ist auch das Sammelgel auspolymerisiert und das Kammersystem kann auseinandgebaut, die Kämme entfernt und anschließend die Gele voneinander getrennt werden. In Folie verpackt können die Gele bei 4°C max. 2 Wochen gelagert werden.

Hinweis:

Bei der Verwendung von Acrylamid (Monomer) muss mit Handschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Es wird unter dem Abzug gearbeitet, bis die Gele fertig auspolymerisiert sind. Alle zu verwendenden Glas- und Aluminiumplatten sollten zum Beseitigen von Fett und Schmutz mit Ethanol abgerieben werden.

3.1.12.1 SDS-PAGE

Die volldenaturierende Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgt nach der von Laemmli (1970) entwickelten Methode. Da Proteine unterschiedliche Ladungs- zu Masseverhältnisse besitzen würden sie im elektrischen Feld nicht nur der Größe nach aufgetrennt. Bei der SDS-PAGE wird das aufzutrennende Proteingemisch vor der Gelelektrophorese mit dem anionischen Detergens SDS versetzt, welches sich an die Proteine anlagert. Dadurch werden die Proteine denaturiert, in Lösung gebracht und mit einer negativ geladenen „SDS-Hülle“ versehen. Damit erhalten sie ein einheitliches Masse- zu Ladungsverhältnis und die Wanderung im elektrischen Feld hängt im Wesentlichen nur noch von der Proteinmasse und der Porengröße des Gels ab.

Material:

3-4x Sparmix [100 mM Tris/HCl pH 6,8; 1,4 M β -Mercaptoethanol; 4% (v/v) SDS; 24% (v/v) Glycerin; 0,4 mM Bromphenolblau]

1x SDS-Laufpuffer [25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% (v/v) SDS; 0,5 mM EDTA]

Proteinlängenmarker (s. 2.5)

15% PAA-Gel

Die aufzutrennende Probe wird vor der Gelelektrophorese mit Sparmix (1/4-1/3 des Probenendvolumens) versetzt und 1 Minute gekocht, um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Als Größenvergleich wird zusätzlich zu der Probe ein Proteinlängenmarker auf das Gel aufgetragen.

Die Gelelektrophorese findet in einer vertikalen Elektrophoresekammer statt, in die ein oder zwei Gele mit Klammern eingespannt werden können. Nach Einspannen des Gels wird die Kammer mit dem Laufpuffer gefüllt. Vor dem Probenauftrag auf das Gel werden die Geltaschen mit Laufpuffer ausgespült. Die denaturierende Elektrophorese findet bei Raumtemperatur statt. Es wird mit 80 V gestartet bis die Probe vollständig in das Trenngel eingewandert ist und dann auf max. 170 V hochgedreht. Durch das im Sparmix enthaltene Bromphenolblau wird die Lauffront der Probe sichtbar gemacht. Die Elektrophorese wird abgebrochen, kurz nachdem die Lauffront unten aus dem Gel herausgelaufen ist.

Die Proteinbanden können anschließend durch Färben mit Coomassie-Blau (Punkt 3.1.12.3) sichtbar gemacht werden.

3.1.12.2 Native PAGE („grünes Gel“)

Ein schwach denaturierendes Gelelektrophoresesystem wird verwendet, um ganze Pigment-Protein-Komplexe aufzutrennen, wobei die Komplexe, sofern sie stabil sind, intakt bleiben. Aus diesem Grund wird diese Form der Gelelektrophorese auch als native oder „grüne“ Gelelektrophorese bezeichnet. Da die Komplexe vor der Gelelektrophorese nicht mit SDS-haltigem Sparmix versetzt und denaturiert werden, hängt ihre Laufstrecke während der Gelelektrophorese nicht nur von ihrer Größe ab, sondern auch von ihrer Eigenladung und Konformation – ein kompakter gefaltetes Protein kann besser die Gelporen passieren und

läuft demnach weiter im Gel als ein weniger kompaktes Protein derselben Größe und Ladung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die native PAGE vor allem dazu verwendet, natives WSCP von anderen Proteinen sowie von freiem Pigment zu trennen (s. 3.1.4), sowie zur Untersuchung des Oligomerisierungsverhaltens unterschiedlich pigmentierter WSCP-Komplexe (s. 4.1.7.3 und 4.1.10.2.2).

Es wurden zwei verschiedene Puffersysteme verwendet: Deriphat- und detergensfreier Puffer. Deriphat ist ein zwitterionisches Detergens und der Deriphat-Laufpuffer wurde z.B. verwendet, um die Stringenz der Elektrophoresebedingungen gegenüber der Elektrophorese mit detergensfreiem Puffer zu erhöhen.

Material:

Laufpuffer: Deriphat [0,15% (w/v) Deriphat; 12 mM Tris; 48 mM Glycin]
detergensfrei [25 mM Tris; 192 mM Glycin]

80% (w/v) Glycerin

8% oder 10% PAA-Gel (0,75 mm oder 1,5 mm dick, je nach Verwendungszweck)

Die Elektrophoresekammer wird wie oben beschrieben (3.1.12.1) aufgebaut. Für analytische Zwecke wird ein PAA-Gel mit einer Dicke von 0,75 mm verwendet, für präparative Zwecke ein Gel mit einer Dicke von 1,5 mm. Zur Beschwerung der Proben wird, wenn nötig, 80%iges Glycerin (ca. 1/8 Probenvolumen) zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgt abgedunkelt (zum Schutz der Pigment-Protein-Komplexe vor Licht) und bei 4°C Kühlung. Gestartet wird bei 40 V, bis die Probe vollständig in das Sammelgel eingelaufen ist, und dann wird auf max. 100 V aufgedreht.

Nach der Gelelektrophorese folgt das Scannen und Fotografieren des Gels und anschließend entweder das Färben mit Coomassie-Blau (s. 3.1.12.3) oder das Eintrocknen zwischen zwei Cellophanstücken bzw. das Ausschneiden der pigmentierten Banden zur weiteren Analyse (s. 3.1.9.2). Die Chl-Fluoreszenz der pigmentierten WSCP-Komplexe im Gel kann wie unter 3.1.12.2.1 beschrieben dokumentiert werden.

3.1.12.2.1 Dokumentation der Chl-Fluoreszenz der mittels nativer PAGE aufgetrennten Chl-WSCP-Komplexe

Um das Vorhandensein auch geringer Mengen pigmentierter WSCP-Komplexe in einem nativen PAA-Gel nachzuweisen, wird die Chl- bzw. Chlid-Fluoreszenz im Gel mit Hilfe der VersaDoc dokumentiert. Dazu wird das PAA-Gel ohne Trägerplatte und Glasplatte in die VersaDoc gelegt, die Chlorophylle mit UV-Licht angeregt und ihre Fluoreszenz mit einem geeigneten Filter aufgenommen.

VersaDoc-Einstellungen zur Dokumentation der Chl-Fluoreszenz

kleines Objektiv (Nikon AF NIKKOR, 50 mm 1:1.4D), Blende maximal offen (Einstellung 1.4)

Software: Quantity One, Version 4.6.3 Basic

→ *nucleic acid gels*

→ *filter: Radiant Red 610 LP, UV Trans, 4 x Gain*

→ *exposure: 480 sec*

3.1.12.3 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Proteine werden im Gel durch Anfärben mit Coomassie-Brilliant-Blue (Serva Blue) sichtbar gemacht. Dieser Trimethylmethanfarbstoff bindet an Proteine und färbt somit Banden auf dem Gel an, die Protein enthalten.

Material:

Coomassie-Färbelösung: [175 mg Serva Blue; 50% (v/v) Ethanol; 7% (v/v) Essigsäure]

Entfärber 1: [10% (v/v) Ethanol; 7% (v/v) Essigsäure]

Entfärber 2: [10% (v/v) Essigsäure]

Nach der Gelelektrophorese wird das Gel zunächst 30 Minuten in eine Gerda-Box mit Coomassie-Färbelösung gelegt und auf dem Schüttler leicht geschwenkt. Danach folgt das Abgießen der Färbelösung und die Zugabe von Entfärber 1. Nach etwa 45 Minuten kann dann dieser Entfärber gegen Entfärber 2 ausgetauscht werden. Zur Unterstützung wird ein Schwamm zugegeben, der den Farbstoff in sich aufsaugt. Nach Abschluss der Entfärbung wird das Gel gründlich mit Wasser gespült und anschließend zwischen Cellophanstücken eingetrocknet.

3.1.13 Western Blot

Mit dieser Methode können elektrophoretisch aufgetrennte Proteine mittels Elektrotransfer auf eine Protein-bindende Membran (Nitrocellulose oder PVDF) übertragen werden. Dabei bleibt das Proteinbandenmuster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Auf der Membran kann dann ein bestimmtes Protein mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde der Western Blot zum Nachweis des WSCP aus *Arabidopsis thaliana* (AtWSCP) im sogenannten „*tank-blot*“-Verfahren durchgeführt, bei dem der Elektrotransfer in einer mit Puffer gefüllten Kassette stattfindet.

Material:

„*tank-blot*“-Kammer (Model TE 22, Hoefer Scientific Instruments, USA)

Blot-Kassette

Rotilabo[®] „Gerda“-Frischhaltebox (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Blotpapier (GB002, Schleicher und Schuell, Dassel)

Schwammeinlage

PVDF-Membran (FLUOROTRANS Transfer Membrane 0,2 µm; Pall Europe Ltd., England))

Methanol

dH₂O

Blotpuffer [20 mM Tris; 150 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol] → 2 Liter; wird bei 4°C gelagert und kann bis zu 5x wiederverwendet werden

TBS(1) [150 mM NaCl; 10 mM TrisHCl pH 7,5]

TBS(2) [250 mM NaCl; 10 mM Tris HCl pH 7,5]

TBSTT [TBS(2); 0,1% (v/v) Triton-X-100; 0,025% (v/v) Tween 20] → Detergenzien erst unmittelbar vor der Verwendung zugeben!

Blocking-Puffer [3% (w/v) BSA in TBS(1)]

1. Antikörper (α-AtWSCP_{his} aus Kaninchen, s. Weil, 2007 (Diplomarbeit))

2. Antikörper (AP-gekoppelter α-„*rabbit*“; Chemicon Int. Inc., USA)

Immun-Star AP Substrate (Bio-Rad, München)

Hinweis:

Alle Blotmaterialien, vor allem die PVDF-Membran, werden nur mit Handschuhen und Blot-Pinzette angefasst!

3.1.13.1 Elektrotransfer („*blotting*“)

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgt in einem PAA-Gel, entweder mittels SDS-PAGE (s. 3.1.12.1) oder nativer PAGE (s. 3.1.12.2). Für den Western Blot wird die PVDF-Membran (zugeschnitten auf die Größe des Gels) auf einem Schüttler in einer „Gerda“-Box für 30 s in Methanol aktiviert, dann für 2 Min. in dH₂O gewaschen und danach 5 Min. mit Blotpuffer inkubiert. Das Blot-„Sandwich“ wird in folgender Reihenfolge zusammengebaut:

Kathodenseite („-“) der Blot-Kassette (schwarz)

Schwammeinlage

Blotpapier

PAA-Gel

PVDF-Membran

Blotpapier

Schwammeinlage

} in Blotpuffer getränkt

Anodenseite („+“) der Blot-Kassette (weiß)

Das Blot-„Sandwich“ wird in der richtigen Orientierung (Transfer erfolgt vom „-“ zum „+“-Pol) in die „*tank-blot*“-Kammer gestellt und mit Blotpuffer (4°C) bedeckt. Der Elektrotransfer erfolgt bei 150 mA für 90 Min. oder alternativ bei 15 mA für 15 St. (über Nacht). Während des Transfers wird der Blotpuffer in der Kammer mittels eines Rührfisches ständig gerührt und die Kammer bei 4°C gekühlt.

3.1.13.2 Absättigung der Membran („*blocking*“)

Vor dem Proteinnachweis mittels spezifischer Antikörper muss die Membran mit einem Protein abgesättigt („geblockt“) werden, welches nicht von dem verwendeten Antikörper erkannt wird. Für den WSCP-Nachweis eignet sich dafür das Protein BSA (Rinderserumalbumin). Dazu wird die PVDF-Membran 1 St. bei RT (alternativ: über Nacht bei 4°C) in 50 ml Blocking-Puffer inkubiert, auf einem Schüttler in einer „Gerda“-Box. Alle weiteren Inkubationsschritte erfolgen ebenfalls in einer „Gerda“-Box auf einem Schüttler.

3.1.13.3 Proteinmarkierung mit 1. und 2. Antikörper

Nun wird die Membran mit dem 1. Antikörper inkubiert, ein polyklonaler, aus Kaninchen gewonnener Antikörper gegen AtWSCP_{His}. Dazu wird der Antikörper 1:30.000 in 20 ml ½ Blocking-Puffer (Blocking-Puffer:dH₂O, 1:1) verdünnt und die Membran in der Antikörper-Lösung 1 St. bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Es folgen drei Inkubations- bzw. Waschschriffe à 10 Min. in je 50 ml TBSTT und ein abschließender Waschschriff in 50 ml TBS.

Nun erfolgt die Inkubation mit dem 2. Antikörper, ein anti-„*rabbit*“ Antikörper, welcher an das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Dazu wird der Antikörper 1:2500 in 20 ml ½ Blocking-Puffer verdünnt und die Membran in der Antikörper-Lösung wieder 1 St. bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Es folgen die Waschschriffe wie oben beschrieben, mit einem abschließenden zusätzlichen Waschschriff in 50 ml TBS.

3.1.13.4 Detektion des Antikörper-markierten Proteins mittels Chemilumineszenz

Die Detektion des WSCP erfolgt mittels Chemilumineszenz. Die Reaktion wird von der mit dem 2. Antikörper gekoppelten Alkalischen Phosphatase katalysiert. Dazu werden 10 ml Chemilumineszenz-Reagenz (5 ml Immun-Star AP Substrat + 5 ml TBS(1)) angesetzt und die Lösung vor Licht geschützt. Die PVDF-Membran wird vor Licht geschützt 5 Min. darin inkubiert und anschließend die Chemilumineszenz mit Hilfe der VersaDoc detektiert. Dazu wird die Membran mit Klebeband auf der schwarzen Probenplatte mittig fixiert und die Platte auf halber Höhe in die VersaDoc eingesetzt.

VersaDoc-Einstellungen für Chemilumineszenz-Detektion:

kleines Objektiv (Nikon AF NIKKOR, 50 mm 1:1.4D), Blende maximal offen (Einstellung 1.4)

Software: Quantity One, Version 4.6.3 Basic

→ *chemiluminescence*

→ *optimize exposure*

→ *3600 sec total*

→ *180 sec interval* (insgesamt 20 Bilder)

3.1.14 Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

Um freies Pigment von Pigment-Protein-Komplexen zu trennen, wurde in dieser Arbeit unter anderem die Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation angewendet. Dabei handelt es sich um eine Sedimentationszentrifugation. Die Trennung beruht auf der unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeit der Probenkomponenten, hervorgerufen durch ihre unterschiedliche Masse. Der Saccharosegradient hat dabei eine zweifache Funktion, da er zum einen für eine bessere Trennschärfe sorgt, zum anderen die Diffusions- und Konvektionsbewegungen verringert, durch die sich die gerade gebildeten Banden wieder verteilen würden.

3.1.14.1 Herstellung von Saccharose-Dichtegradienten

Material:

Saccharose p.a.
 50 mM NaP pH 7,8
 dH₂O
 Polyallomer-Zentrifugenröhrchen der Firma Beckmann (11 ml Inhalt für präparative Gradienten)

Gradientenrezept für WSCP-Proben

0,3 M Saccharose
 NaP pH 7,8 (5-20 mM, je nach NaP-
 Konzentration der Probe)

Gradientenrezept für LHCII-Proben (s. 3.1.10.3)

0,4 M Saccharose
 20 mM NaP pH 7,8
 0,1% (w/v) Laurylmaltosid (LM)

Zur Herstellung der Saccharose-Dichtegradienten wird die Saccharose in der benötigten Menge abgewogen, die entsprechend benötigte Menge 50 mM NaP pH 7,8 zugegeben und mit dH₂O fast auf das Endvolumen aufgefüllt. Bei der Lösung für die LHCII-Proben wird noch das Detergens LM zugegeben. Der Ansatz wird gründlich gerührt, bis die Saccharose *vollständig* gelöst ist, und erst dann mit dH₂O auf das Endvolumen aufgefüllt. Schließlich wird die Lösung noch einmal gerührt, sodass sie vollkommen homogen ist.

Die Saccharoselösung wird nun in die Zentrifugenröhrchen gefüllt (ca. 11 ml pro Röhrchen), bis ungefähr 0,5 cm unter den Rand, und die Röhrchen anschließend bei -20°C eingefroren. Vor Gebrauch werden die Röhrchen langsam (ca. 4 Stunden bei 4°C) aufgetaut. Dabei bildet sich ein kontinuierlicher Saccharose-Dichtegradient aus.

Zu beachten ist, dass die Röhrchen während des Einfrierens, Auftauens, sowie im aufgetauten Zustand nicht erschüttert werden, da der Saccharosegradient dadurch ungleichmäßig würde oder sogar ganz zerstört würde.

3.1.14.2 Ultrazentrifugation in Saccharose-Dichtegradienten

Vor dem Auftragen der Proben werden die obersten, am wenigsten Saccharose enthaltenden, 400-500 µl der Gradienten verworfen, um ein Einsinken der Probe in den Gradienten beim Probenauftrag zu vermeiden. Danach folgt der Auftrag der Probe, ohne den Gradienten dabei aufzuwirbeln. Anschließend wird exakt austariert (in den Gehängen!). Erst danach wird der vorgekühlte Rotor (SW40 bzw. SW41, Beckmann) aus dem Kühlraum entnommen und die Gehänge sorgfältig eingehängt. Der Rotor wird dann in die Zentrifuge eingestellt, ohne dabei zu verkanten. Die Ultrazentrifugation findet über Nacht statt (ca. 16-20 St.) bei 4°C und 37.000 Upm.

Am folgenden Tag wird die Zentrifuge geöffnet, der Rotor entnommen, auf Verunreinigungen geprüft und die Dichtegradientenröhrchen aus den Gehängen entnommen. Die Röhrchen werden zur Dokumentation mit einer Digitalkamera fotografiert und anschließend die aufgetrennten Banden vorsichtig und langsam mit einer Spritze aus den Gradienten abgesaugt. Die abgesaugten Lösungen werden danach bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Hinweis:

Da bei der Ultrazentrifugation Beschleunigungen bis zu 100.000 g vorkommen, muss besonders sorgfältig austariert werden, sodass die Differenz zwischen zwei gegenüberliegenden Röhren gleich „Null“ ist.

3.1.15 Spektroskopie

3.1.15.1 Absorptionsspektroskopie

In dieser Arbeit wurde die Absorptionsspektroskopie verwendet, um die Konzentrationen von Proteinen und von Pigmenten in Lösung zu bestimmen. Auch die Konzentration von Pigment-Protein-Komplexen konnte so bestimmt werden. Es wurden die UV-Vis-Absorptionsspektrometer UV-2101PC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) und V-550 (Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt) verwendet.

3.1.15.1.1 Aufnahme von Standard-Absorptionsspektren

Messparameter V-550:

measurement range: variabel
scanning speed: 200 nm/min
band width: 2.0 nm
response: quick
data pitch: 0.5 nm

Messparameter UV-2101PC:

wavelength: variabel
scan speed: medium
slit width: 2.0 nm
sampling interval: 1.0

Für die Messungen im sichtbaren Wellenlängenbereich werden Küvetten aus optischem Spezialglas oder Einmalküvetten verwendet. Für Messungen im UV-Bereich werden Quarzküvetten verwendet. Alle verwendeten Küvetten haben eine Schichtdicke von 1 cm.

Die Spektren werden im Zweistrahlphotometer gegen eine Referenzlösung gemessen. Als Referenzlösung dient jeweils der Puffer bzw. das Lösungsmittel, in dem sich die zu messende Probe befindet. Für die Messung der Baseline werden beide Küvetten mit Referenzlösung gefüllt.

3.1.15.1.2 Tieftemperatur (77K)-Absorptionsspektroskopie

In dieser Arbeit wurden Tieftemperaturabsorptionsspektren von nativen LHCII-Komplexen aufgenommen. Die Spektren wurden mit dem Absorptionsspektrometer UV-2101PC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) gemessen.

Material:

80% (w/v) Glycerin (in 0,1% LM / 50 mM NaP pH 7,8)
 LHC-Verdünnungslösung [0,1% LM; 50 mM NaP pH 7,8]
 LHCII-Probe (s. 3.1.10.3)

Messparameter UV-2101PC, 77 K:

wavelength: 750 nm - 350 nm

scan speed: medium

slit width: 1.0 nm

Interval: 0.2 nm

repeat scan: 9

Das Photometer wird gemäß beiliegender Anleitung vorbereitet. Es wird für diese Messung als Einstrahlphotometer mit einer speziell für die Tieftemperaturmessung eingesetzten Messkammer verwendet. 200 µl Probe werden mit 600 µl 80% Glycerin versetzt, gründlich gemischt und in eine Halbmikro-Einmalküvette pipettiert. Es wird darauf geachtet, dass die Küvette nicht beschlagen ist, bevor sie in die Messkammer platziert wird. Die Messung erfolgt bei 77 K in flüssigem N₂. Bei Bedarf kann flüssiger N₂ über einen Papierfilter in das Dewar-Gefäß der Messkammer nachgefüllt werden. Es werden 9 aufeinanderfolgende Spektren gemessen, die anschließend gemittelt werden. Als Referenz dient eine Mischung aus 200 µl LHC-Verdünnungslösung und 600 µl 80% Glycerin. Von der Referenz werden ebenfalls 9 aufeinanderfolgende Spektren gemessen und das gemittelte Spektrum wird von dem gemittelten Spektrum der Probe subtrahiert.

3.1.15.1.3 Zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie

Die in dieser Arbeit gezeigten zeitaufgelösten transiente Absorptionsspektren wurden von Dr. Christoph Theiss und Stefan Andree, Kooperationspartner am Institut für Optik und Atomare Physik (IOAP) der TU Berlin, gemessen. Die Methode ist nachzulesen in Theiss, 2006 (Dissertation), sowie Theiss *et al.*, 2007.

3.1.15.2 Circular Dichroismus (CD)-Spektroskopie

Unter Circular Dichroismus versteht man die Eigenschaft eines Chromophors, rechts- und linksdrehendes, circular polarisiertes Licht unterschiedlich stark zu absorbieren. Chlorophylle, Xanthophylle sowie aromatische Aminosäuren (Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin) weisen diese Eigenschaft auf und sind daher mit der CD-Spektroskopie zu erfassen. Dabei stellt ein CD-Spektrum im Prinzip ein Differenzspektrum der Absorption von links- minus rechtsdrehend polarisierten Lichts dar.

Freie Chromophore in Lösung besitzen im sichtbaren Wellenlängenbereich ein CD-Signal, dessen Lagen der Maxima denen der Absorptionsspektren entsprechen (intrinsisches CD-Signal). In Pigment-Protein-Komplexen, jedoch, liegen die Chromophore in ihren Bindungsstellen vor und besitzen eine definierte Orientierung zueinander im Raum. Da sie in solchen Komplexen eng benachbart sind, können ihre π-Elektronenwolken sich gegenseitig beeinflussen, wodurch sich das resultierende CD-Spektrum entsprechend diesen Wechselwirkungen ändert (excitonisches CD-Signal). Im sichtbaren Bereich des Lichts lassen CD-Spektren somit Aussagen über die Bindung der Chlorophylle und Xanthophylle und die Abstände zueinander zu. Ein CD-Spektrum stellt damit einen „Fingerabdruck“ der gemessenen Probe dar.

Im UV-Bereich kann mit Hilfe der CD-Spektroskopie der relative Anteil verschiedener Sekundärstrukturen bei Proteinen ermittelt werden. Der Hauptchromophor im Protein ist die Amid-Gruppe der Peptidbindung. Je nach Sekundärstruktur des Proteins (α -Helix, β -Faltblatt oder Zufallsknäuel) sind die Amid-Gruppen der Peptidbindungen unterschiedlich zueinander orientiert und ergeben daher charakteristische CD-Signale. Diese unterschiedlichen Absorptionseigenschaften verhalten sich additiv, so dass das UV-CD-Spektrum eines Proteins sich aus der Summe der einzelnen Spektren der enthaltenen Sekundärstrukturen ergibt.

In dieser Arbeit wurde die CD-Spektroskopie im sichtbaren Wellenlängenbereich (Vis) unter anderem dazu verwendet, den Rekonstitutionserfolg bei rekombinantem WSCP zu kontrollieren, sowie die Stabilität/Intaktheit der pigmentierten WSCP-Komplexe nach Hitzeeinwirkung zu überprüfen. Mittels CD-Messungen im UV-Bereich wurde untersucht, ob sich pigmentiertes und unpigmentiertes WSCP in ihrer Konformation unterscheiden.

3.1.15.2.1 Aufnahme von UV/Vis-CD-Spektren

CD-Spektrometer: Jasco J-810-S (Jasco Labor- u. Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt)

Peltier-Element: Modell CDF-426S/426L

Software: Spectra Manager, Version 1.6

Messparameter Vis, Standardspektrum:

Programmeinstellung: Spectrum Measurement

sensitivity: standard

measurement range: 750 - 350 nm

data pitch: 0,5 nm

scanning mode: continuous

scanning speed: 100 nm/min

response: 2 sec

band width: 4 nm

accumulation: variabel

temperature: variabel

Küvette: 2 mm Pfadlänge

Messparameter UV:

Programmeinstellung: Spectrum Measurement

sensitivity: standard

measurement range: 240 - 190 nm

data pitch: 0,5 nm

scanning mode: continuous

scanning speed: 50 nm/min

response: 4 sec

band width: 4 nm

accumulation: 1

temperature: 4°C

Küvette: 1 mm Pfadlänge

Messparameter Vis, Hitzestabilitätsmessungen (s. 4.1.7.1):

Programmeinstellung: Interval Scan Measurement

sensitivity: standard

measurement range: 750 - 350 nm

data pitch: 1 nm

scanning mode: continuous

scanning speed: 200 nm/min

response: 2 sec

band width: 2 nm

no. of spectra: 30

interval: no wait

accumulation: 1

temperature: 95°C

Küvette: 2 mm Pfadlänge

Alle Messungen werden in Quarzküvetten durchgeführt, die je nach Pfadlänge mit dem entsprechenden Adapter in die Messkammer des CD-Geräts eingesetzt werden. Bei den Hitzestabilitätsmessungen, die bei 95°C durchgeführt werden (s. 4.1.7.1), wird zusätzlich ein Deckel auf der Küvette mit Parafilm fixiert, um ein Verdampfen der Probe zu verhindern. Bei allen Messungen wird als Referenz auch ein Spektrum des entsprechenden Probenpuffers gemessen und dieses bei der Auswertung (Einstellung „Spectra Analysis“ im Programm „Spectra Manager“) vom Probenspektrum subtrahiert.

Die Messungen im UV-Bereich sind sehr störanfällig durch Komponenten im Probenpuffer. Daher werden diese Proben in 5 mM NaP (pH 7,8) gemessen. Um die Proben in diesen Puffer zu überführen, wird das Probenvolumen mehrere Male durch Ultrafiltration in Amicon Ultra-4 Filtern (10°C, 6000 Upm, Rotor 1015, Hettich) auf 1/10 des Ausgangsvolumens eingengt und anschließend mit 5 mM NaP wieder auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt. Die WSCP-Proben werden für die Messung auf eine Konzentration zwischen 0,1 und 0,2 mg/ml (ca. 4,3 - 9,2 μM) eingestellt. Bei der Messung wird darauf geachtet, dass die Spannung des Detektors (HT, *high tension voltage*) bei 190 nm nicht über 550 mV liegt, da sonst die Messdaten ungenau werden.

3.1.15.2.2 Auswertung der Messdaten der UV-CD-Spektren

Die Messdaten der im UV-Bereich gemessenen CD-Spektren werden mit der Online-Software DichroWeb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>) ausgewertet. Die gemessenen CD-Daten haben die Einheit θ (Theta Machine Units, gemessen in mdeg) und werden von DichroWeb in die Einheit $\Delta\epsilon$ (Delta Epsilon, gemessen in mdeg $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) konvertiert, unter Angabe des „*mean residue weight*“ (MRW) des gemessenen Proteins, sowie der Pfadlänge der Messküvette und der Proteinkonzentration der Probe. Die Einheit $\Delta\epsilon$ gibt die molare CD-Absorption pro Aminosäurerest an, so dass sich Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen miteinander vergleichen lassen.

Mit DichroWeb wird das gemessene Spektrum mit Spektren von Proteinen bekannter Struktur verglichen und mit geeigneten Algorithmen die relativen Anteile der drei Sekundärstrukturen herausgerechnet. Das Programm erstellt hieraus ein kalkuliertes Spektrum („Fit“), welches mit dem experimentellen Spektrum möglichst übereinstimmen sollte. Ein Maß für die Abweichung ist der NRMSD („*normalized root mean square deviation*“). Liegt dieser Wert unter 0,1, stimmt das kalkulierte Spektrum sehr gut mit den experimentell gemessenen Daten überein (Mao *et al.*, 1982; Lobley *et al.*, 2002).

Für die Auswertung der WSCP-Spektren wird in DichroWeb der Algorithmus CDSSTR gewählt (näheres zu CDSSTR siehe Compton und Johnson Jr., 1986; Manavalan und Johnson Jr., 1987; Sreerama und Woody, 2000). Als Referenz für die Kalkulationen wird „Reference Data Set 4“ ausgewählt. Dieser Referenzdatensatz umfasst die CD-Spektren von 43 löslichen Proteinen bekannter Struktur, gemessen in dem Wellenlängenbereich 190-240 nm. Um als gültige Lösung akzeptiert zu werden, muss der mit CDSSTR kalkulierte „Fit“ folgende Kriterien erfüllen: 1) die Summe der Anteile der einzelnen Sekundärstrukturen liegt zwischen 0,95 und 1,05; 2) jeder Sekundärstrukturanteil ist größer als -0,03; 3) NRMSD (s.o.) ist kleiner als 0,25 $\Delta\epsilon$.

3.1.15.3 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie ermöglicht es, unter anderem, die Intaktheit von Pigment-Protein-Komplexen mit excitonisch gekoppelten Chromophoren zu überprüfen. Des Weiteren können anhand von Fluoreszenzspektren Rückschlüsse auf den Energietransfer zwischen den gebundenen Chromophoren und auf die Pigmentbindung in den Pigment-Protein-Komplexen gezogen werden.

3.1.15.3.1 Aufnahme eines Standard-Fluoreszenzspektrums

In dieser Arbeit wurden Standard-Fluoreszenzspektren aufgenommen, um nativen LHCII auf seine Intaktheit zu untersuchen, vor und nach seiner Interaktion mit WSCP (s. 4.2.4.1). In LHCII liegen die Chlorophylle excitonisch gekoppelt vor und Chl *b* überträgt bei Anregung die Anregungsenergie auf Chl *a*. Ist der Pigment-Protein-Komplex nicht mehr richtig gefaltet oder sogar zerfallen, findet die Energieübertragung nur noch teilweise oder gar nicht statt und die Anregungsenergie wird stattdessen von Chl *b* als Fluoreszenz emittiert. Bei intakten, korrekt gefalteten Komplexen, hingegen, fluoresziert nur das über Chl *b* angeregte Chl *a*. Wird Chl *b* bei einer Wellenlänge von 470 nm angeregt, fluoresziert freies, ungebundenes Chl *b* bei 653 nm. Bei einer Anregungswellenlänge von 410 nm fluoresziert freies Chl *a* bei 675 nm. Findet Energieübertragung von Chl *b* auf Chl *a* statt, d.h. liegen die Pigmente im Protein gebunden und korrekt angeordnet vor, fluoresziert Chl *a* bei 680 nm, wenn Chl *b* mit 470 nm angeregt wird.

Für die Aufnahme eines Standard-Fluoreszenzspektrums wird die LHCII-Probe mit dem entsprechenden Puffer 1:1000 verdünnt, sodass sie bei 670 nm eine Absorption von ca. 0,005 besitzt. Gemessen werden die Fluoreszenzspektren im Fluoromax-2 (Jobin Yvon Spectroscopy, Grasbrunn) mit der Software Datamax (Version 2.24). Die Messung findet in 5 mm Küvetten in einer 90° Anordnung (Anregungslichtquelle/Probe/Fluoreszenzdetektor) statt.

Messparameter Fluoromax-2:

Increment: 1,0 nm

Slits, Excitation 1: 4,0 nm

Slits, Excitation 2: 4,0 nm

Integration Time: 0,5 sec

Excitation: 470 nm

Measurement Range: 750-600 nm

Temperature: 6°C

3.1.15.3.2 Tieftemperatur (10K)-Fluoreszenzspektroskopie

Die in dieser Arbeit gezeigten Tieftemperatur-Fluoreszenzspektren von WSCP (s. 4.1.6.3.2) wurden von Franz-Josef Schmitt, Kooperationspartner am Institut für Optik und Atomare Physik (IOAP) der TU Berlin, gemessen. Die Methode ist nachzulesen in Schmitt *et al.*, 2008.

3.2 Molekularbiologische Methoden

Wichtig: Alle verwendeten Enzyme werden beim Arbeiten in -20°C Kühlblöcken gehalten und ausschließlich mit sterilen „*extended length*“ Filterspitzen pipettiert, um eine Kontamination der Enzymlösung zu vermeiden!

3.2.1 Bakterienanzucht

In dieser Arbeit wurden *Escherichia coli*-Bakterien der Stämme JM101 und Rosetta(DE3) verwendet. Alle Arbeiten mit sterilen Bakterienkulturen wurden an einer Sterilbank durchgeführt, welche vor und nach Benutzung mit 70% Ethanol ausgewischt wurde. Es wurden autoklavierte Pipettenspitzen bzw. autoklavierte Glaspipetten verwendet. Alle Geräte, die nicht autoklaviert werden konnten, wurden mit 70% Ethanol vor und nach Gebrauch abgewischt. Geöffnete Gefäße wurden vor dem Wiederverschließen an ihrer Öffnung abgeflammt.

Bakterien wurden als Flüssig- oder Plattenkulturen in Luria-Bertani(LB)-Medium in Anwesenheit eines geeigneten Antibiotikums angezogen. Dabei wurden Flüssigkulturen verwendet, um daraus Proteine oder Plasmide zu isolieren (s. 3.1.5 bzw. 3.2.6.3), während Plattenkulturen zum Vereinzeln von Bakterienkolonien dienten, wie es beispielsweise nach einer Transformation (s. 3.2.8.4) nötig war.

Material:

LB-Medium [1% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) NaCl; pH 7,5 (NaOH)], autoklavieren

LB-Platten [wie LB-Medium; zusätzlich 1,5% (w/v) Agar], autoklavieren

Ampicillin(Amp)-Stammlösung (100 mg/ml in dH₂O; alkalisieren der Lösung mit 5 M NaOH auf ca. pH 8, um Amp zu lösen) → für Klone BoWSCPhis, mBoWSCPhis und AtWSCPhis

Chloramphenicol(CAP)-Stammlösung (34 mg/ml) → für Klon AtWSCPhis

3.2.1.1 Flüssigkulturen

Das LB-Medium wird in den für das benötigte Volumen passenden Erlenmeyerkolben gefüllt, der Kolben mit einem Deckel aus Aluminiumfolie abgedeckt und autoklaviert. Zum Anlegen von Dauerkulturen (s. 3.2.2) reichen 5 ml LB-Medium aus, welche in einem 20 ml Reagenzglas mit Deckel autoklaviert werden. Das sterile LB-Medium kann bis zur Verwendung bei RT aufbewahrt werden. Unmittelbar vor der Verwendung wird das entsprechend benötigte Antibiotikum dem LB-Medium zugesetzt; bei Ampicillin beträgt die Endkonzentration im Medium 100 µg/ml, bei Chloramphenicol beträgt die Endkonzentration im Medium 34 µg/ml.

Flüssigkulturen in Erlenmeyerkolben werden in der Regel bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert (200 Upm) – eine Ausnahme bildet die Inkubation bei 28°C, die bei der Überexpression von rekombinantem WSCP durchgeführt wird (s. 3.1.5). Die 5 ml Bakterienkulturen im Reagenzglas werden im Wärmeschrank bei 37°C im Drehrad inkubiert.

Bei einer Übernacht-Kultur, wie sie z.B. für die Plasmidpräparation benötigt wird (s. 3.2.6.3), beträgt die Inkubationszeit ca. 15 Stunden.

Um eine Bakterienkultur in frisches LB-Medium zu überimpfen, wird entweder eine einzelne Kultur mit einer ausgeglühten Impföse oder einer sterilen Pipettenspitze von einer Agarplatte (s. 3.2.1.2) gepickt und in das Flüssigmedium überführt, oder es wird ein Teil einer Flüssigkultur mit einer sterilen Glaspipette in frisches LB-Medium überführt.

3.2.1.2 Plattenkulturen

Zum Gießen von LB-Agarplatten wird das Agar-haltige LB-Medium in einer Autoklavierflasche autoklaviert und noch warm in Petrischalen gegossen (je ca. 20 ml Volumen). Das hitzelabile Antibiotikum wird erst nach Abkühlen des Mediums auf ca. 50°C zugegeben, unmittelbar vor dem Gießen der Platten. Bei Ampicillin beträgt die Endkonzentration im Medium 100 µg/ml, bei Chloramphenicol 34 µg/ml.

Zur Vereinzelung von Klonen können Bakterien mit Hilfe einer ausgeglühten Impföse auf einer Antibiotika-haltigen LB-Agarplatte ausgestrichen werden. Um zu verhindern, dass Kondenswasser auf die Klone tropft und sie vermischt, wird die Platte anschließend mit dem Deckel nach unten im Wärmeschrank bei 32°C über Nacht inkubiert. Die Petrischale wird schließlich mit Parafilm rundum verschlossen und kann so bei 4°C ca. einen Monat gelagert werden.

3.2.2 Anlegen einer Dauerkultur

Zur Daueraufbewahrung transformierter Bakterien werden 400 µl einer 5 ml Übernacht-Kultur (s. 3.2.1.1) mit 600 µl 80% (w/v) Glycerin in einem sterilen Reaktionsgefäß gemischt und bei -70°C eingefroren.

3.2.3 DNA-Quantifizierung

3.2.3.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Bei relativ großen DNA-Mengen, wie sie z.B. nach einer Plasmidisolierung vorliegen, wird die DNA-Konzentration photometrisch über das Absorptionsmaximum der Nucleinsäuren bei 260 nm bestimmt. Dabei gilt:

$OD_{260\text{ nm}} = 1$ entspricht 50 µg doppelsträngige DNA/ml.

Diese Methode erlaubt gleichzeitig eine Reinheitskontrolle der DNA. Dazu wird der Quotient aus der Extinktion bei 260 nm und der Extinktion bei 280 nm (= Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren) ermittelt. Dieser sollte zwischen 1,6 und 1,9 liegen. Ein Wert von 1,8 entspricht 100% Reinheit – ist er niedriger, liegt eine Verunreinigung mit Protein vor, ist

er höher, liegt eine Verunreinigung mit RNA vor. Als Vergleichswert dient die Extinktion bei 320 nm – bei einer reinen Probe sollte er nahezu bei Null liegen.

Die photometrische Konzentrationsbestimmung erfolgt mit dem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) in den zugehörigen UV-Einmalküvetten. Zur Kalibrierung des Gerätes bzw. als Referenz dient ddH₂O. Für die Messung werden 5 µl Probe mit 65 µl ddH₂O verdünnt (1:14-Verdünnung). Das Gerät misst die Extinktion bei 260, 280 und 320 nm und berechnet daraus automatisch die Konzentration und Reinheit der Probe – die einzelnen Messwerte werden trotzdem notiert und die Quotienten nachgerechnet.

3.2.3.2 Quantifizierung mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Quantifizierung kleinerer DNA-Mengen, z.B. bei einer Konzentrationsbestimmung von Vektor und Insert für eine Ligation, erfolgt über eine Agarose-Gelelektrophorese (s. hierzu Punkt 3.2.4). Dazu wird die zu quantifizierende Probe neben einem Basenpaarstandard definierter Konzentration auf ein Agarosegel aufgetragen (verwendete Basenpaarstandards s. Punkt 2.6). Nach Auftrennung der Probe mittels Gelelektrophorese wird das Gel in der VersaDoc (Bio-Rad, München) mit UV-Licht bestrahlt und die Fluoreszenz der mit Ethidiumbromid angefärbten DNA dokumentiert. Die Fluoreszenzintensität der Probe kann mit der Fluoreszenzintensität der Markerbanden bekannter Konzentrationen verglichen und so die Konzentration der Probe abgeschätzt werden. Für ein genaueres Ergebnis kann eine densitometrische Auswertung mit Hilfe der VersaDoc-Software erfolgen (Quantity One, Version 4.6.3 Basic; Einstellungen s. 3.2.4.2).

Im Gegensatz zur photometrischen Konzentrationsbestimmung erlaubt diese Methode keine Überprüfung der Probe auf Proteinverunreinigung, aber es kann eine eventuelle Verunreinigung mit anderen DNA-Fragmenten festgestellt werden, wenn diese in nennenswerten Mengen in der Probe vorliegen. Zudem kann bei dieser Form der DNA-Quantifizierung auch gleichzeitig überprüft werden, ob das DNA-Fragment die richtige Größe besitzt.

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Eine gängige Methode zur Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA ist die Elektrophorese in Agarosegelen. Da Nucleinsäuren über einen großen pH-Bereich hinweg eine negative Ladung besitzen, wandern sie im elektrischen Feld in Richtung Anode. Bei einem pH-Wert > 5,0 sind Masse und Ladung von DNA-Fragmenten zueinander proportional und die Laufstrecke im Gel ist somit – bei linearisierter DNA – direkt von der Fragmentgröße abhängig. Große DNA-Fragmente laufen dabei langsamer im Gel als kleine, die weniger Widerstand durch die Gelporen erfahren. Es lassen sich also bei der Agarose-Gelelektrophorese DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe auftrennen und analysieren bzw. präparieren.

Je nach Größe des aufzureinigenden Fragments wird eine Agarosekonzentration zwischen 0,8% und 2% gewählt:

Tab. 3-13: Agarosekonzentrationen und entsprechende Fragmentlängen-Trennbereiche.

Fragmentlänge (kb)	Agarosekonzentration (w/v)
0,8 bis 15	0,8 %
0,5 bis 7	1,0 %
0,1 bis 3	2,0 %

3.2.4.1 Herstellung von Agarosegelen

Material:

10x TAE-Puffer [0,4 M Tris; 10 mM EDTA; pH 8,0 mit Eisessig einstellen]
 Agarose p.a.

Folgende Angaben gelten für einen vollen Gelschlitten (9 Gele):

Die Glasplatten, die als Träger für die Gele dienen, werden mit 100% Ethanol gereinigt, auf den Gelschlitten aufgesetzt und die Kämmen eingesetzt. Mit einer Wasserwaage wird der Gelschlitten auf absolut waagerechten Stand überprüft.

Die entsprechend benötigte Menge an Agarose (s. Tab. 3-13) wird in der Mikrowelle (Achtung vor Siedeverzug!) in 100 ml 1x TAE-Puffer aufgeköcht und gelöst. Je 10 ml der heißen Agaroselösung werden auf jede Glasträgerplatte des Gelschlittens pipettiert. Nach Erstarren der Agarose können die Kämmen entfernt werden. Bis zur weiteren Verwendung werden die Gele in einer mit feuchtem Küchenkrepp ausgelegten „Gerda“-Box bei 4°C aufbewahrt (max. 2 Wochen haltbar).

3.2.4.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Material:

Agarosegel (0,8 - 2% Agarose, s. Tab. 3-13)
 DNA-Lösung
 10x Minigel-Auftragspuffer [0,1% (w/v) Bromphenolblau; 0,1% (w/v) Xylencyanol; 10 mM NaOH; 80% (v/v) Formamid (deionisiert); 1 mM EDTA]
 Basenpaarstandards (NEB, Schwalbach, s. 2.6)
 Ethidiumbromid(EtBr)-Färbebad [5 mg/ml EtBr in dH₂O]; Vorsichtsmaßnahmen zum Arbeiten mit EtBr:
 s.u. unter „Hinweis“

Die Elektrophorese erfolgt in einer horizontalen Gelkammer, die mit 1x TAE-Puffer gefüllt ist. Das Agarosegel wird auf seiner Glasträgerplatte in die Elektrophoresekammer gelegt, wobei darauf geachtet wird, dass die Geltaschen vollständig mit Puffer bedeckt werden. Zum

Beschweren und Anfärben der DNA-Lösung wird diese vor dem Gelauftrag mit 1/10 Volumen Minigel-Auftragspuffer versetzt. Anschließend wird die DNA-Lösung in die dafür vorgesehenen Geltaschen pipettiert und als Größen- und Konzentrationsvergleich der entsprechend benötigte Basenpaarstandard (s. 2.6) ebenfalls in eine Geltasche aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei 140 V gestartet und nach ca. 10 Minuten (wenn sich die beiden Lauffronten, Bromphenolblau und Xylencyanol getrennt haben) auf 190 V hochgedreht.

Sobald die DNA ausreichend weit gelaufen ist (das Bromphenolblau des Minigel-Auftragspuffers läuft etwa auf gleicher Höhe wie ein 500 bp großes DNA-Fragment), wird die Elektrophorese abgebrochen und das Gel aus der Kammer entnommen. Anschließend wird das Gel in ein Ethidiumbromid-Färbebad gelegt und ca. 10 Min. bei RT inkubiert. Das Ethidiumbromid (EtBr) dient zum Anfärben der DNA, da es aufgrund seiner planaren Form in die große Furche doppelsträngiger DNA interkalieren kann und nach UV-Anregung bei 590 nm fluoresziert. Zum Entfernen des überschüssigen EtBr wird das Gel noch mal 10 Min. in dH₂O inkubiert. Zur weiteren Handhabung wird das fertige Gel nun auf ein Plastiktablett gelegt.

Handelt es sich um ein analytisches Gel, wird es (auf dem Plastiktablett!) unter UV-Anregung in der VersaDoc fotografiert und mit der Quantity One Software (s.u.) analysiert.

Bei einem präparativen Gel, aus dem bestimmte DNA-Banden ausgeschnitten und weiterverwertet werden sollen, wird wie unter Punkt 3.2.6.1 beschrieben weiterverfahren.

Einstellungen VersaDoc Gel Imaging System:

Software: Quantity One, Version 4.6.3 Basic

→ *nucleic acid gels*

→ *ethidiumbromide*

→ *exposure: 10 sec*

Hinweis:

EtBr permeiert die Haut und wirkt aufgrund seiner Interaktion mit der DNA karzinogen. Daher müssen bei der Handhabung mit EtBr Nitrilhandschuhe getragen werden. Es wird ausschließlich an einem designierten Arbeitsplatz mit EtBr gearbeitet und alle Arbeitsutensilien, die mit EtBr in Kontakt kommen, werden nach dem Gebrauch gründlich unter viel fließendem Wasser abgespült. EtBr-haltiger Müll (fest oder flüssig) wird in speziell dafür vorgesehenen Abfallbehältern entsorgt.

3.2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ermöglicht es, eine einzige Kopie einer bestimmten DNA-Sequenz mehr als millionenfach zu vervielfältigen, vorausgesetzt, deren flankierende DNA-Sequenzen sind bekannt. Dabei erfolgt die Vervielfältigung exponentiell in mehreren hintereinanderfolgenden PCR-Zyklen. Ein PCR-Zyklus gliedert sich in drei Abschnitte unterschiedlicher Temperatur:

- 1) *Strangtrennung*: Die doppelsträngige DNA-Matrize („Template“), auf der die zu vervielfältigende Sequenz liegt, wird bei ca. 95°C in ihre Einzelstränge zerlegt;
- 2) *„Annealing“ der Primer*: Hybridisierung der beiden Primer an die komplementären Sequenzen der Matrizen-DNA; die Temperatur bei diesem Schritt richtet sich nach den Schmelzpunkten der beiden Primer, die wenn möglich nicht zu weit auseinander liegen sollten;
- 3) *DNA-Synthese bzw. -Verlängerung*: Verlängerung (Elongation) der von den Primern ausgehenden DNA-Sequenz bzw. des jeweiligen komplementären DNA-Stranges; dieser Schritt erfolgt bei 72°C, dem Temperaturoptimum der hitzestabilen DNA-Polymerase.

Eine PCR besteht meistens aus ca. 25-40 Wiederholungen (Zyklen) dieser drei Schritte, wobei das zwischen den beiden Primern liegende DNA-Stück amplifiziert wird.

Folgende Primer wurden in dieser Arbeit verwendet:

Tab. 3-14: In dieser Arbeit verwendete PCR-Primer. Beim Mutagenese-Primer C-Ex_WSCP^{his} sind die gegenüber der Matrizen-DNA veränderten Basen fettgedruckt/unterstrichen hervorgehoben.

Primername	Richtung	Sequenz	Bindestelle (5')
At1WSCP ⁺	<i>forward</i> (+)	5' - GAT TCC TCA TCA GCT CCC AAG - 3'	<u>Genom von <i>Arabidopsis thaliana</i>:</u> bp 27219887 auf Chromosom 1, Gen At1g72290 (WSCP-Gen); 370 bp downstream des Start-Codons <u>Klon AtWSCP^{his}:</u> 309 bp downstream der SphI-Schnittstelle im Insert <u>Klone BoWSCP^{his} und mBoWSCP^{his}:</u> 331 bp downstream der SphI-Schnittstelle im (m)BoWSCP ^{his} -Insert *
At1WSCP ⁻	<i>reverse</i> (-)	5' - TCG ATG TCA CGA GAT CCA CG - 3'	bp 27220506 auf Chromosom 1 von <i>Arabidopsis thaliana</i> , 345 bp downstream des Stopp-Codons von Gen At1g72290 (WSCP-Gen)
C-Ex_WSCP ^{his} ⁺	<i>forward</i> (+)	5' - CCG AA AGT GCC ACC TGA C - 3'	133 bp upstream der EcoRI-Schnittstelle auf dem pDS12/RBSII-Vektor
C-Ex_WSCP ^{his} ⁻	<i>reverse</i> (-)	5' - CCT TAA <u>AGC</u> TTA <u>CTA</u> CTC AAC ACG TG - 3'	16 bp upstream des Stopp-Codons beim Klon BoWSCP ^{his} ; führt neues Stopp-Codon ein sowie eine HindIII-Schnittstelle dahinter
DS23 ⁺	<i>forward</i> (+)	5' - ATT TGC TTT GTG AGC GG - 3'	ca. 22 bp downstream der XhoI-Schnittstelle im pDS12/RBSII-Vektor
DS178 ⁻	<i>reverse</i> (-)	5' - GGA GTT CTG AGG TCA TTA CTG G - 3'	ca. 38 bp downstream der HindIII-Schnittstelle im pDS12/RBSII-Vektor; verlängerte Version vom S1-Primer
pROK2_LB ⁻	<i>reverse</i> (-) **	5' - GT GGA CCG CTT GCT GCA ACT - 3'	auf tDNA-Transformationsvektor pROK2, 84 bp vor <i>left border</i> der tDNA in der <i>Arabidopsis</i> -WSCP-k.o.-Mutante SALK_009681 (in dieser Arbeit als ΔWSCP bezeichnet)

* At1WSCP⁺ bindet bei niedriger Annealingtemperatur (55°C) auch an BoWSCP, da die DNA-Sequenz von BoWSCP an der Primerbindestelle fast identisch zu der Sequenz von AtWSCP ist (nur 3 „*mis-matches*“).

** pROK2_LB⁻ wird in dieser Arbeit als *forward*(+)-Primer verwendet, da die tDNA, an die er bindet, in *antisense*-Orientierung in das *Arabidopsis*-Gen At1g72290 inseriert ist. Siehe hierzu auch 3.2.7.1.

3.2.5.1 Standard-PCR

Die Standard-PCR wurde in dieser Arbeit unter anderem dafür verwendet, WSCP-*“knock-out“*-Mutanten genetisch zu charakterisieren (s. 3.2.7).

<u>Standard-PCR-Ansatz à 50µl</u>		<u>PCR-Programm: INGA65.CYC</u>			
Template [10 ng]	x µl	Lid Heat On 110°C			
(+)-Primer [10 pmol/µl]	10 µl		<u>h</u> <u>m</u> <u>s</u>		
(-)-Primer [10 pmol/µl]	10 µl	95°C	0:02:00		
10x PWO-Puffer	5 µl	95°C 65°C 72°C	0:00:30		
dNTPs [25 mM each]	0,4 µl			0:01:00	40x
PWO-Polymerase [1 U/µl]	2,5 µl				
ddH ₂ O	<u>y</u> µl	72°C	0:10:00		
	50 µl	Lid Heat Off			
		4°C	forever		

Wurde eine niedrigere Annealing-Temperatur (55°C) gewünscht, wurde das PCR-Programm INGA55.CYC verwendet. Dies ist bis auf die Annealing-Temperatur mit dem Programm INGA65.CYC identisch.

3.2.5.2 Mutagenese-PCR

Die Methode der PCR kann auch eingesetzt werden, um gezielt eine oder mehrere Mutationen in das zu amplifizierende DNA-Stück einzuführen. Dazu wird die Mutation in Form einer der beiden oder beider Primer eingeführt. Dabei sind die Primersequenzen bis auf die Mutation (befindet sich etwa in der Mitte des Primers) zu dem Template komplementär und können somit problemlos an die DNA-Matrize binden.

In dieser Arbeit wurde die Mutagenese-PCR bei der Klonierung von mBoWSCPhis (s. 3.2.8) verwendet. Es wurde hierdurch bei dem Ausgangsklon BoWSCPhis ein neues Stopp-Codon eingeführt, welches zur Deletion der 10 C-terminalen Aminosäuren führte, sowie eine neue HindIII-Schnittstelle für die Klonierung eingeführt.

Verwendetes PCR-Programm: INGA55.CYC (s. 3.2.5.1)

Verwendete Primer (vgl. Tab. 3-14):

C-Ex_WSCP⁺: 5'-CCG AA AGT GCC ACC TGA C-3'

C-Ex_WSCP⁻ (Mutageneseprimer): 5' CCT TAA AGC TTA CTA CTC AAC ACG TG - 3'

3.2.5.3 „Dirty“-PCR

Bei einer „Dirty“-PCR (auch Kolonie-PCR genannt) wird als Template nicht aufgereinigte DNA eingesetzt, sondern Bakterien, welche die Template-DNA enthalten. Diese Form der PCR wird verwendet, um nach einer Transformation zu überprüfen, ob die Bakterien das gewünschte Plasmid aufgenommen haben.

Um die Bakteriensuspension für die PCR herzustellen, wird eine einzelne Bakterienkolonie mit einer sterilen Pipettenspitze von der Transformationsplatte „gepickt“ und in 10 µl sterilem ddH₂O suspendiert.

In dieser Arbeit wurde die „Dirty“-PCR verwendet, um den Erfolg der Klonierung von mBoWSCPhis zu überprüfen (vgl. 3.2.8.1).

Ansatz für „Dirty“-PCR (30 µl)

Bakteriensuspension (Template)	1 µl
(+)-Primer [10 pmol/µl]	3 µl
(-)-Primer [10 pmol/µl]	3 µl
10x Taq-Puffer S	3 µl
dNTPs [25 mM each]	0,24 µl
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,2 µl
ddH ₂ O	<u>19,56 µl</u>
	30 µl

Verwendetes PCR-Programm: INGA55.CYC (s. 3.2.5.1)

Verwendete Primer (vgl. Tab. 3-14):

At1WSCP⁺: 5' - GAT TCC TCA TCA GCT CCC AAG - 3'
 DS178: 5'- GGA GTT CTG AGG TCA TTA CTG G - 3'

3.2.5.4 Sequenzierungs-PCR

Um die DNA-Sequenz neuer Klone zu überprüfen, wird der interessierende DNA-Abschnitt mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977) sequenziert. Bei der Sequenzierungs-PCR wird im Gegensatz zur Standard-PCR (s. 3.2.5.1) nur ein einziger Primer eingesetzt. Je nach Bedarf wählt man dazu einen *forward*(+)- oder einen *reverse*(-)-Primer. Das Sequenziergel und die Sequenzieranalyse werden von der Firma Genterprise, Mainz, durchgeführt. Das Ergebnis der Sequenzierung kann mit der Software „Chromas“ (Version 1.45) ausgewertet werden.

In dieser Arbeit wurde die Sequenzierungs-PCR durchgeführt, um die Sequenz des neu hergestellten Klons, mBoWSCPhis, zu überprüfen.

<u>Standard-Sequenzieransatz (10 µl):</u>		<u>PCR-Programm: BIG.CYC</u>	
Template (Plasmid)	300 ng	Lid Heat On 110°C	
Primer [10 pmol/µl]	1 µl		h m s
5x Sequencing-buffer	2 µl	{ 96°C 0:00:10 55°C 0:04:00 }	30x
Big Dye Premix (Version 3.1)	2 µl		
ddH ₂ O, steril	auf 10 µl auffüllen	Lid Heat Off	
		4°C forever	

Verwendete Primer (vgl. Tab. 3-14):

DS23⁺ : 5´ - ATT TGC TTT GTG AGC GG - 3´

DS178⁻ : 5´ - GGA GTT CTG AGG TCA TTA CTG G - 3´

DS23⁺ wurde für die N-terminale Sequenzierung von mBoWSCPhis verwendet; DS178⁻ wurde für die C-terminale Sequenzierung verwendet.

3.2.6 DNA-Extraktion und -Aufreinigung

Es wurden in dieser Arbeit verschiedene Methoden verwendet, um DNA zu isolieren und aufzureinigen.

3.2.6.1 Aus einem Agarose-Gel

Diese Methode wurde vor allem dazu verwendet, um PCR-Produkte und mit Restriktionsenzymen verdaute DNA aufzureinigen.

Material:

Agarosegel (je nach Fragmentgröße 0,8% - 2% Agarose, s. Tab. 3-13)
 Skalpell
 UV-Lampe
 E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
 (Isopropanol)

Die DNA-Probe wird auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. hierzu Punkt 3.2.4) aufgetrennt. Nach Abbruch der Gelelektrophorese wird das Gel in einem Ethidiumbromidbad inkubiert, um die DNA anzufärben (Vorsichtsmaßnahmen s. 3.2.4.2). Das gewünschte DNA-Fragment wird anschließend unter einer UV-Lampe zügig (UV-Licht schädigt die DNA!) mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein vorgewogenes Reaktionsgefäß überführt. Das Volumen des Gelstücks wird anhand seines Gewichts bestimmt. Anschließend wird aus diesem Gelstück die DNA mit dem E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) nach Angaben des Herstellers extrahiert und aufgereinigt.

3.2.6.2 Aus einem PCR-Ansatz

Diese Methode wurde dazu verwendet, um PCR-Produkte direkt aus dem PCR-Ansatz aufzureinigen. Die so aufgereinigte DNA konnte anschließend beispielsweise für einen Restriktionsverdau (s. 3.2.8.2) eingesetzt werden.

Material:

peqGOLD Cycle-Pure Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
ddH₂O, steril
(100% Ethanol, p.a.)

Die PCR wird durchgeführt wie in 3.2.5 beschrieben. Mit Hilfe des peqGOLD Cycle-Pure Kits (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) wird das PCR-Produkt nach Herstellerangaben an eine DNA-bindende Säule gebunden und aufgereinigt. Die Elution erfolgt mit 40 µl sterilem ddH₂O (handwarm). Die Quantifizierung der DNA erfolgt photometrisch im BioPhotometer (s. 3.2.3.1).

3.2.6.3 Aus einer Bakterienkultur, Plasmidisolierung („Miniprep“)

Plasmide sind ringförmige, extrachromosomale DNA-Moleküle, die bei Bakterien, Hefe und einigen höheren eukaryotischen Zellen vorkommen und die sich in der Zelle autonom replizieren können. Sie werden aus Bakterienzellen isoliert und aufgereinigt, um sie beispielsweise in Transformationen, PCR-Ansätzen oder in Sequenzierungs- bzw. Restriktionsreaktionen einsetzen zu können. In dieser Arbeit wurde das Plasmid aus dem neu synthetisierten Klon mBoWSCPhis (s. 3.2.8) isoliert, um DNA für die Langzeitaufbewahrung zu erhalten.

Material:

15 ml Bakterien-Übernacht-Kultur
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
ddH₂O, steril

Um größere Mengen möglichst reiner DNA zu isolieren wird ein Plasmidisolierungs-Kit verwendet.

Als Ausgangsmaterial dient eine Bakterien-Übernacht-Kultur (s. 3.2.1.1) des mBoWSCPhis-Klons, die in 15 ml LB-Amp-Medium angezogen wurde. Die Plasmidisolierung erfolgt mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen), nach Herstellerangaben. Dabei wird die Bakterienkultur pelletiert, in RNase-haltigem Puffer einer alkalischen Lyse unterzogen und dann neutralisiert. Nach einem Zentrifugationsschritt wird das geklärte Lysat auf eine DNA-bindende Säule geladen und die DNA dort gewaschen und getrocknet. Schließlich wird die isolierte Plasmid-DNA mit 50 µl sterilem ddH₂O (handwarm) von der Säule eluiert.

Die Konzentration und Reinheit der isolierten DNA werden photometrisch bestimmt (s. 3.2.3.1) und die Plasmid-DNA schließlich bei -20°C aufbewahrt.

3.2.6.4 Aus *Arabidopsis*-Pflanzenmaterial

Die Isolierung der DNA aus *Arabidopsis thaliana* erfolgte nach der „quick and dirty“ DNA-Extraktionsmethode von Edwards *et al.*, 1991. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur ausgeführt. Die so extrahierte DNA diente als Template für PCR-Reaktionen (s. 3.2.5.1 sowie 3.2.7).

Material:

DNA-Extraktionspuffer [200 mM TrisHCl pH 8; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA pH 8; 0,5% SDS]

TE-Puffer [10 mM TrisHCl pH 8; 1 mM EDTA]

Isopropanol p.A.

70% Ethanol p.A. (-20°C)

Ein kleines Blatt (alternativ: ein Blattstück mit dem Deckel eines Reaktionsgefäßes ausstanzen) wird mit 400 µl DNA-Extraktionspuffer versetzt, mit einem Stößel im Reaktionsgefäß zerrieben und 2 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Falls mehrere Proben parallel extrahiert werden, kann die Mischung sogar länger als 1 Stunde inkubiert werden. Die Probe wird anschließend abzentrifugiert (2 Min., 14000 rpm, Tischzentrifuge). Vom Überstand werden 300 µl in ein frisches Reaktionsgefäß pipettiert, mit 300 µl Isopropanol versetzt und durch Invertieren (ca. 5x) gemischt. Nach weiteren 2 Min. Inkubation wird die Probe 5 Min. abzentrifugiert (14000 rpm, Tischzentrifuge). Der Überstand wird vorsichtig abgehoben und verworfen. Das Pellet wird mit 500 µl kaltem (-20°C) 70% Ethanol gewaschen und nochmals kurz abzentrifugiert. Der ethanolische Überstand wird wieder vorsichtig entfernt und verworfen, das Pellet wird an der Luft getrocknet. Das trockene Pellet wird schließlich in 100 µl TE-Puffer gelöst (Reaktionsgefäß nur anschnippen, nicht vortexen!). Falls sich das Pellet nicht vollständig lösen lässt, kann die Probe 15 Min. bei 65°C im Wasserbad inkubiert werden. Anschließend wird die Probe nochmals kurz abzentrifugiert und der Überstand verwendet.

Zur Lagerung kann die so extrahierte DNA bei -20°C eingefroren werden. Allerdings empfiehlt es sich, die DNA vorher in kleinere Aliquots (z.B. 10 µl) zu portionieren, da wiederholtes Auftauen und wieder Einfrieren dieser DNA-Proben die Qualität mindert.

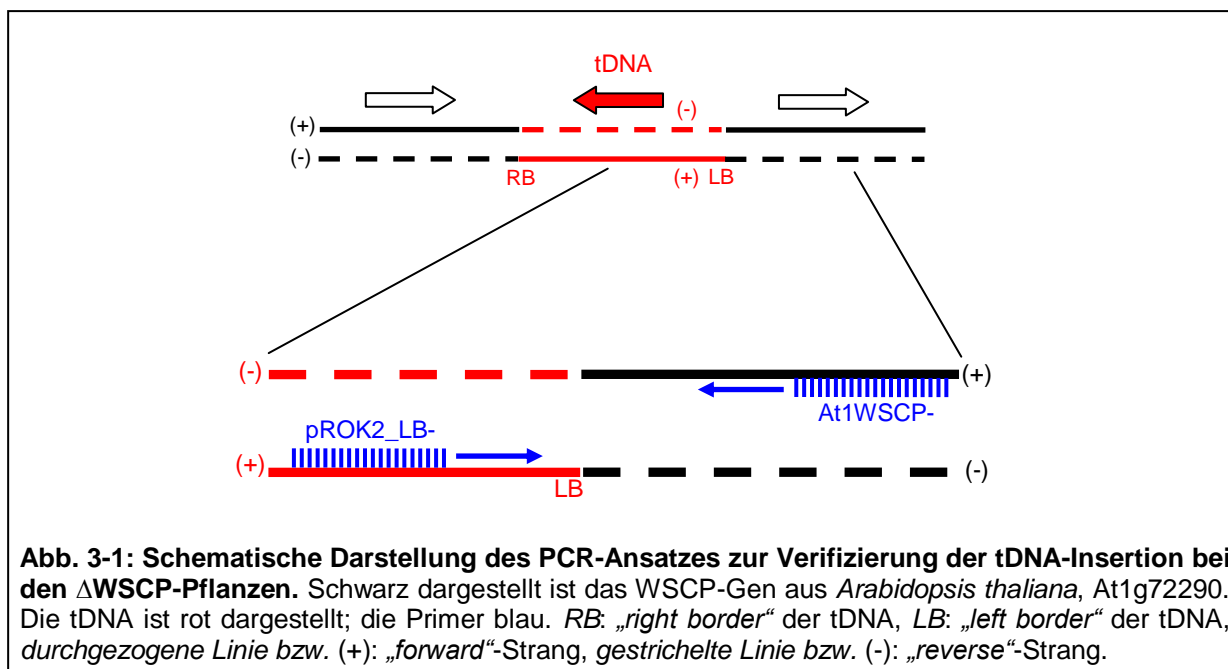
3.2.7 Genetische Charakterisierung der Δ WSCP-Mutante

Bevor Experimente mit den WSCP-„knock-out“-Mutanten (Δ WSCP) durchgeführt werden konnten, musste erst eine F3-Generation angezüchtet werden und diese hinsichtlich der Mutation untersucht werden. Es wurde zum einen überprüft, ob tatsächlich tDNA in das

WSCP-Gen inseriert hat und das Gen somit ausgeschaltet ist; zum anderen wurden die Δ WSCP-Pflanzen auf Homozygotie bezüglich des Gen-„*knock-outs*“ untersucht.

3.2.7.1 Verifizierung der tDNA-Insertion/des WSCP-Gen-„*knock-outs*“

Aus den Δ WSCP-*Arabidopsis*-Pflanzen wird DNA isoliert wie in 3.2.6.4 beschrieben. Mit dieser DNA als Template wird eine PCR wie in 3.2.5.1 beschrieben durchgeführt, bei der einer der Primer an die tDNA bindet und der andere an das WSCP-Gen (At1g72290) bindet. Falls die Pflanzen das tDNA-Insert im WSCP-Gen besitzen, wäre demnach ein PCR-Produkt zu erwarten. Als Negativkontrolle dient die DNA von Wildtyp (WT)-Pflanzen vom gleichen Ecotyp (Columbia 0) wie die „*knock-out*“-Mutanten, da bei der WT-DNA der eine Primer aufgrund der fehlenden tDNA-Sequenz nicht binden kann. Die Bindung der Primer ist in Abb. 3-1 schematisch dargestellt:



3.2.7.2 Test auf Homozygotie

Um zu überprüfen, ob es sich bei den Δ WSCP-Pflanzen um einen homozygoten oder einen heterozygoten Gen-„*knock-out*“ handelt, wird eine PCR wie in 3.2.5.1 beschrieben durchgeführt, bei der die Primer 5'- und 3'-seitig der tDNA-Insertionsstelle auf dem WSCP-Gen binden. Unter den gewählten Versuchsbedingungen kann bei homozygoten Δ WSCP-Pflanzen kein PCR-Produkt entstehen, da die tDNA mit > 4000 bp zu groß ist, um amplifiziert zu werden. Sind die Pflanzen jedoch heterozygot, fehlt die tDNA-Insertion auf einem Allel und der Bereich zwischen den beiden Primern kann dort amplifiziert werden. Die Bindung der Primer ist in Abb. 3-2 schematisch dargestellt:

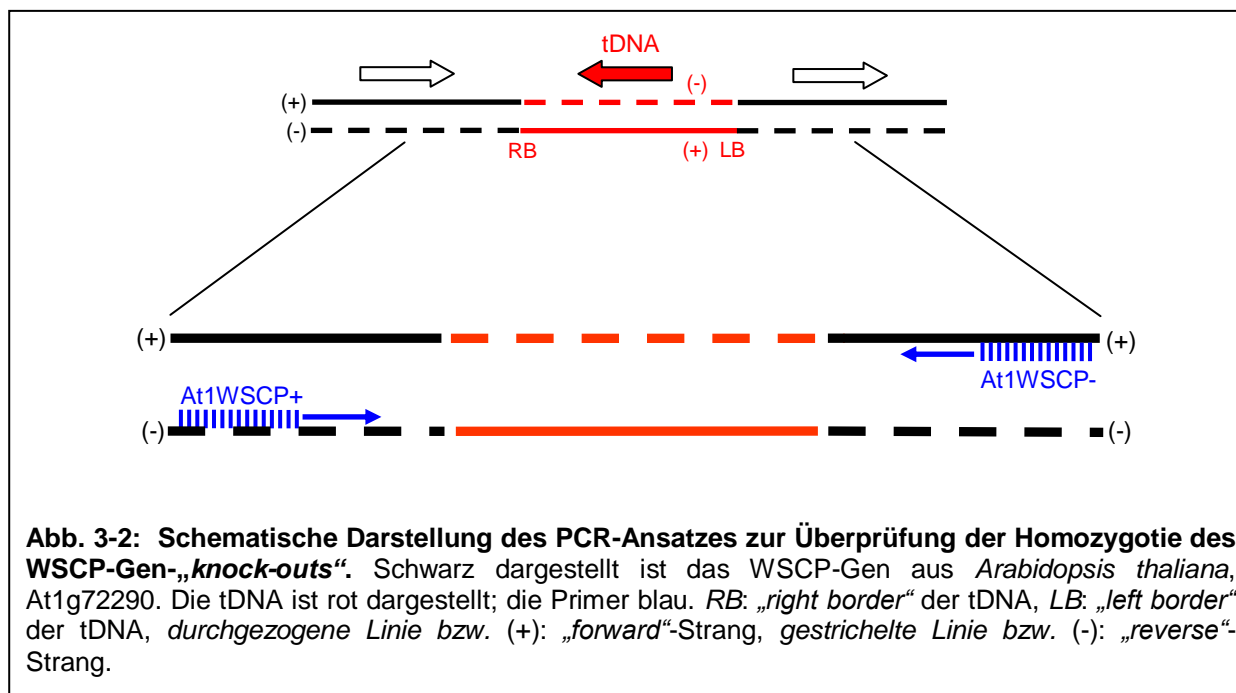


Abb. 3-2: Schematische Darstellung des PCR-Ansatzes zur Überprüfung der Homozygotie des WSCP-Gen-„knock-outs“. Schwarz dargestellt ist das WSCP-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, At1g72290. Die tDNA ist rot dargestellt; die Primer blau. RB: „right border“ der tDNA, LB: „left border“ der tDNA, durchgezogene Linie bzw. (+): „forward“-Strang, gestrichelte Linie bzw. (-): „reverse“-Strang.

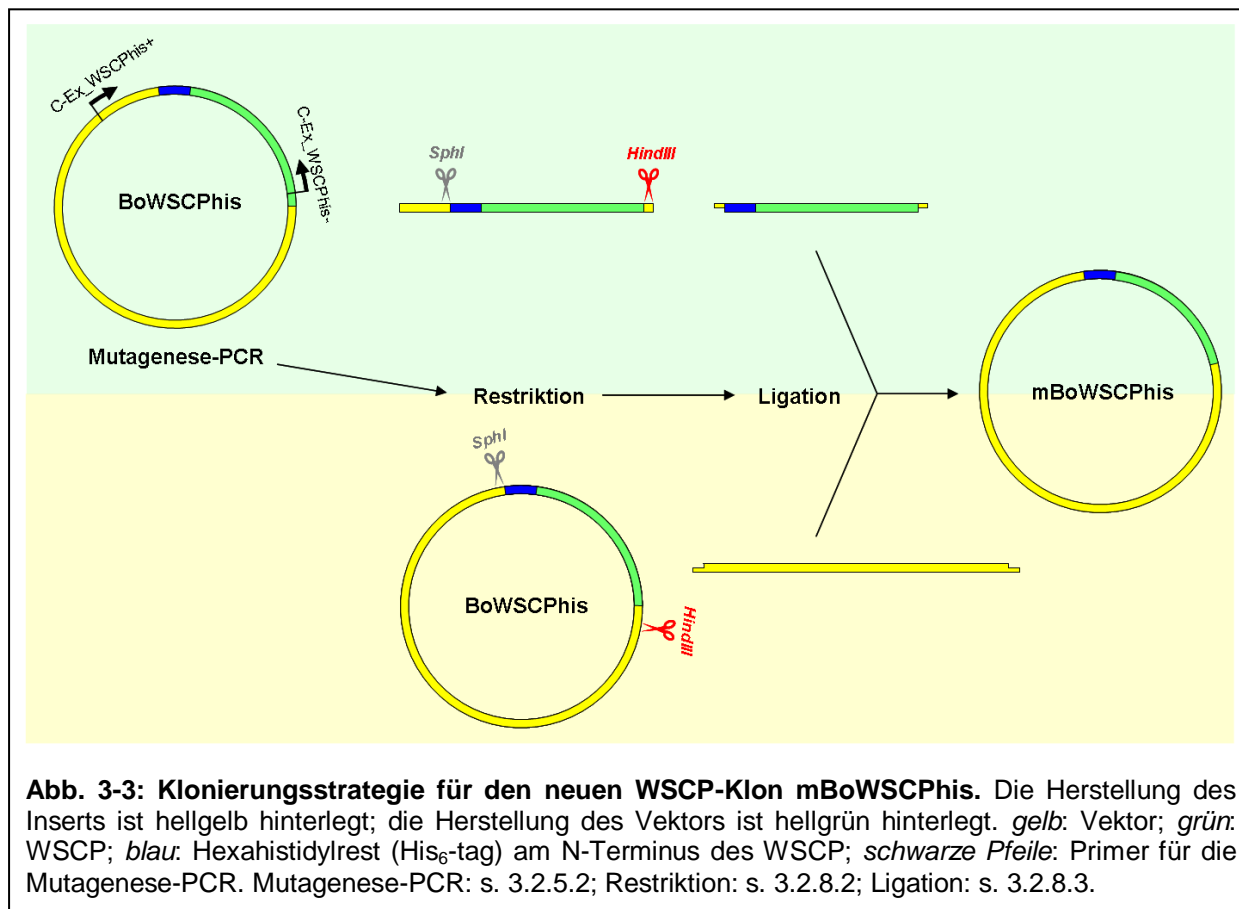
3.2.8 Herstellung des WSCP-Klons mBoWSCPHis

3.2.8.1 Klonierungsstrategie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neuer Klon des Blumenkohl-WSCPs hergestellt, der sich von dem bereits vorhandenen Klon, BoWSCPHis, darin unterscheidet, dass die 10 C-terminalen Aminosäuren fehlen. Der neue Klon wurde mBoWSCPHis benannt, da seine Sequenz durch die Deletion dieser 10 Aminosäuren der Sequenz des *maturen* Blumenkohl-WSCPs entspricht (Sato *et al.*, 1998).

Als Ausgangsklon für die Klonierung diente BoWSCPHis, welcher im Rahmen der Dissertation von Kristin Schmidt (2003) hergestellt wurde (in Schmidt, 2003, als WSCP-his bezeichnet). Mittels einer Mutagenese-PCR (s. 3.2.5.2) wurde die für das WSCP-Protein codierende Sequenz amplifiziert und dabei gleichzeitig ein neues Stopp-Codon eingebaut, welches zur Deletion der 10 C-terminalen Aminosäuren führte. Zusätzlich wurde dabei hinter das neue Stopp-Codon eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym HindIII eingebaut. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt (s. 3.2.6.2), mit den Restriktionsendonucleasen SphI und HindIII verdaut (s. 3.2.8.2) und anschließend mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt (s. 3.2.6.1). Das verdaute und aufgereinigte PCR-Produkt diente als Insert in der nachfolgenden Ligrationsreaktion (s. 3.2.8.3). Als Vektor bei der Ligation diente das ebenfalls mit SphI und HindIII verdaute BoWSCPHis Plasmid, aus dem der für die WSCP Vollängensequenz codierende Bereich bei der Restriktion herausgeschnitten wurde. Der geschnittene, aufgereinigte Vektor stand bereits aus einer anderen Arbeit zur Verfügung (Weil, 2007, Diplomarbeit). Nach der Ligation wurden kompetente JM101-Zellen mit dem Ligrationsprodukt transformiert (s. 3.2.8.4). Schließlich wurde der Erfolg der Klonierung mittels „Dirty“-PCR (s. 3.2.5.3) sowie Überexpression im

Mini-Maßstab (s. 3.2.8.4) überprüft. In der nachfolgenden Abbildung ist die Klonierungsstrategie schematisch dargestellt:



3.2.8.2 Restriktion

Es handelt sich hierbei um eine sehr wichtige Methode der Molekularbiologie. Sie dient u.a. dazu, isolierte Plasmide auf ihre Länge zu untersuchen, um Plasmide zu linearisieren und um Vektoren und Inserts für eine Ligation vorzubereiten.

Bei einer Restriktion wird doppelsträngige DNA von sogenannten Restriktionsendonucleasen gespalten. Dies sind prokaryotische Enzyme, welche mit hoher Sequenzspezifität vier bis acht Basenpaare in einem DNA-Strang erkennen und ihn mit Präzision schneiden. Die von Restriktionsenzymen erkannten DNA-Sequenzen sind meist palindromisch, es gibt jedoch auch Ausnahmen.

Bei einem Restriktionsverdau entstehen Fragmente, die ein 5'-Phosphat- und ein 3'-OH-Ende besitzen und entweder „*blunt ends*“ oder „*sticky ends*“ haben. Bei „*blunt ends*“ handelt es sich um eine glatte Schnittstelle, d.h. beide Stränge der DNA werden an der gleichen Stelle geschnitten. Restriktionsenzyme, die versetzt schneiden, erzeugen „*sticky ends*“, d.h. überstehende Enden.

Material:

aufgereinigte DNA (Plasmid oder PCR-Produkt)
 Restriktionsendonuclease(n)
 Reaktionspuffer

Folgende Restriktionsendonucleasen wurden in dieser Arbeit für die Klonierung von mBoWSCPhis verwendet:

Tab. 3-15: Verwendete Restriktionsendonucleasen. Die Enzyme und Puffer wurden von New England Biolabs (NEB, Schwalbach) bezogen.

Enzym	Schnittstelle	Reaktionspuffer	Temperatur-optimum	Units / μ l
SphI	5' – GCATG/C – 3' 3' – C/GTACG – 5'	NEB 2	37°C	5
HindIII	5' – A/AGCTT – 3' 3' – TTCGA/A – 5'	NEB 2	37°C	20

Reaktionspuffer:

NEB 2 [50 mM NaCl; 10 mM TrisHCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT; pH 7,9]

In diesem Fall wird der gesamte aufgereinigte PCR-Ansatz aus der Mutagenese-PCR (s. 3.2.5.2) für die Restriktion eingesetzt, entsprechend 1,7 μ g DNA in einem Volumen von 35 μ l. Es werden 4 μ l NEB 2 Reaktionspuffer (1/10 Endvolumen) zugegeben. Zum Schluß werden 0,25 μ l HindIII und 1 μ l SphI zugegeben (entspricht jeweils 5 Units) und der Reaktionsansatz kurz durch Invertieren gemischt. Das Endvolumen beträgt 40,25 μ l.

Der Restriktionsansatz wird über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch eine 20-minütige Inkubation bei 65°C im Wasserbad abgebrochen. Um die Vollständigkeit der Restriktion zu überprüfen, werden ca. 40 ng DNA (1 μ l Restriktionsansatz) auf ein 1,5% TAE-Agarosegel aufgetragen und mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (s. 3.2.4.2). Als Negativkontrolle dient das unverdaute PCR-Fragment.

Um die Restriktionsenzyme von der verdauten DNA zu trennen, wird der Restriktionsansatz auf ein präparatives 1,5% TAE-Agarosegel aufgetragen und ebenfalls elektrophoretisch aufgetrennt. Das verdaute DNA-Fragment wird wie in 3.2.6.1 beschrieben mit dem E.Z.N.A. DNA-Extraktionskit (Peqlab) aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt.

Schließlich erfolgt die Konzentrationsbestimmung mit dem Biophotometer wie in 3.2.3.1 beschrieben.

Das geschnittene und aufgereinigte DNA-Fragment dient als Insert für die Ligation (s. 3.2.8.3) bei der Herstellung des neuen Klons mBoWSCPhis.

3.2.8.3 Ligation

Wenn zwei DNA-Fragmente komplementäre überhängende Enden („*sticky ends*“) besitzen, können diese miteinander hybridisieren. Die DNA-Ligase kann dann die beiden DNA-Fragmente unter Ausbildung einer neuen Phosphodiesterbindung miteinander verknüpfen, indem sie die Kondensation der 5'-Phosphatgruppe mit der 3'-Hydroxygruppe unter ATP-Verbrauch katalysiert.

Um komplementäre Enden der zu ligierenden DNA-Fragmente zu schaffen, werden sie mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut (s. 3.2.8.2).

Material:

Vektor (ca. 50 ng)
 Insert (3-fach molarer Überschuss zu Vektor)
 Quick Ligation Kit (NEB, Schwalbach)
 ddH₂O, steril

Für die Ligationsreaktion der SphI/HindIII-verdauten DNA-Fragmente (mBoWSCPhis-Insert und Vektor, s. 3.2.8.1 bzw. 3.2.8.2) wird das Quick Ligation Kit von New England Biolabs (NEB, Schwalbach) verwendet. Die Molaritäten von Insert und Vektor werden nach der Anleitung des Kits berechnet:

$$\text{Molarität} = [(\mu\text{g}/\mu\text{l}) / (\text{Basenpaare} \cdot 650 \text{ Da})] \cdot 2 \text{ Enden}$$

Es werden ca. 50 ng Vektor eingesetzt, sowie ein 3-fach molarer Überschuss an Insert. Die Ligation wird nach Anleitung des Kits durchgeführt und der Ansatz insgesamt 10 Min. bei RT inkubiert. Zusätzlich wird eine Kontroll-Ligation angesetzt, bei der anstelle des Inserts dasselbe Volumen ddH₂O eingesetzt wird. Die Kontrolle dient später dazu, den prozentualen Anteil des Ligationsansatzes zu bestimmen, der Religationen von unvollständig verdautem Vektor (und somit kein Insert) enthält. Somit kann die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Ligation von Vektor und Insert abgeschätzt werden. Durch Dephosphorylierung des Vektors (Methode s. Trostmann, 2004 (Diplomarbeit)) können Religationen von einfach geschnittenem Vektor verhindert werden. Im Anschluss an die Ligation erfolgt die Transformation kompetenter JM101-Zellen mit dem Ligationsansatz bzw. Kontroll-Ligationsansatz (3.2.8.4).

3.2.8.4 Transformation

Unter Transformation versteht man das Überführen von Fremd-DNA (z.B. genetisch veränderte Plasmide) in kompetente Bakterienzellen. Da die in dieser Arbeit verwendeten Klone auf einem pDS-Vektor liegen, der für ein Ampicillin-Resistenzgen (β -Lactamase) codiert, können die erfolgreich transformierten Zellen anschließend auf ampicillinhaltigen Agarplatten selektiert werden.

Material:

kompetente JM101-Zellen
DNA-Lösung (Miniprep oder Ligationsansatz)
LB-Medium ohne Ampicillin (s. 3.2.1)
LB-Amp-Platten (s. 3.2.1.2)

Ein 50 µl Aliquot kompetenter JM101-Zellen wird ca. 5 Min. auf Eis aufgetaut und dann mit einer vorgekühlten Pipettenspitze mit 10 µl DNA-Lösung (in diesem Fall: Ligationsansatz bzw. Kontrollansatz, s. 3.2.8.3) versetzt und sehr vorsichtig (die Zellen sind sehr empfindlich!) dabei gerührt. Die Transformationsansätze werden 30 Min. auf Eis inkubiert, möglichst ohne sie zu erschüttern. Es folgt ein Hitzeschock für 5 Min. bei RT, der die Aufnahme der Fremd-DNA begünstigt. Anschließend werden zu jedem Ansatz 250 µl vortemperiertes (37°C) Ampicillin-freies LB-Medium zugegeben, vorsichtig gemischt und die Ansätze anschließend 1 St. bei 37°C im Drehrad inkubiert.

Danach werden 200 µl jedes Transformationsansatzes auf einer vorgewärmten (37°C) LB-Amp-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 32°C im Wärmeschrank inkubiert. Um zu verhindern, dass Kondenswasser auf die Bakterienkolonien tropft, werden die Platten mit dem Deckel nach unten gelagert.

Am folgenden Tag werden die Kolonien auf beiden Platten ausgezählt. Im Idealfall sollten keine Kolonien auf der Kontrollplatte gewachsen sein.

3.2.8.4.1 Überprüfen des Transformationserfolges

Je nachdem, wie hoch das Verhältnis der Kolonienanzahl auf der Ligationsplatte zu der Kolonienanzahl auf der Kontrollplatte ist, werden eine oder mehrere Einzelkolonien von der Ligationsplatte mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in je 10 µl sterilem ddH₂O resuspendiert. Hieraus werden jeweils *sofort* 5 µl entnommen und in 500 µl steriles LB-Amp-Medium (s. 3.2.1) überführt, um eine Überexpression im Mini-Maßstab durchzuführen. Die restlichen in ddH₂O resuspendierten Bakterien werden für eine „dirty“-PCR eingesetzt (s.u.).

Bei der Überexpression im Mini-Maßstab soll festgestellt werden, ob die erfolgreich transformierten Bakterien das neue Protein überexprimieren können. Die in 500 µl sterilem LB-Amp-Medium resuspendierten Bakterien werden 2,5 St. bei 37°C im Drehrad inkubiert, bei maximaler Umdrehungszahl. Die Expression wird durch Zugabe von 5 µl 100 mM IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. Nach 4 weiteren Stunden Inkubation im Drehrad werden die Bakterien abzentrifugiert (1 Min., 10.000 rpm, Tischzentrifuge). Das Volumen der Pellets wird per Augenmaß geschätzt. Bei einem geschätzten Volumen von ca. 3 µl wird ein Pellet mit 18 µl dH₂O und 7 µl 3-4x Sparmix (s. 3.1.12.1) versetzt – diese Volumina werden entsprechend dem geschätzten Pelletvolumen angepasst. Jede Probe wird durch kräftiges Vortexen gut gemischt und schließlich eine SDS-PAGE (s. 3.1.12.1) mit 3 µl jeder Probe durchgeführt, um zu sehen, ob von den Bakterienkolonien das gewünschte Protein überexprimiert wurde.

Um zu überprüfen, ob tatsächlich das richtige Plasmid (mBoWSCPhis) in den gepickten Kolonien enthalten ist, wird mit je 1 µl der in ddH₂O resuspendierten Bakterien (s.o.) eine

„Dirty PCR“ wie in 3.2.5.3 beschrieben durchgeführt. Damit kann überprüft werden, ob das Insert die richtige Länge besitzt. Als Negativkontrolle dient der Ausgangsklon, BoWSCPhis. Bei mBoWSCPhis wird ein PCR-Produkt mit einer Länge von 331 bp erwartet, bei BoWSCPhis eine Länge von 502 bp.

Zusätzlich soll überprüft werden, ob der neue Klon die richtige DNA-Sequenz besitzt. Dazu wird aus einer Bakterienkolonie des neuen Klons eine 15 ml Übernacht-Kultur (s. 3.2.1.1) angesetzt, aus der am folgenden Tag die Plasmid-DNA isoliert wird (Miniprep, s. 3.2.6.3). Mit der aufgereinigten Plasmid-DNA wird eine Sequenzier-PCR durchgeführt wie in 3.2.5.4 beschrieben.

3.3 Pflanzenphysiologische Methoden

3.3.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Für die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* wird eine 6:1-Mischung aus Torfkultursubstrat (TKS2, Florigard) und Vermiculit (Körnung 3, Dämmstoff-Fabrik Klein GmbH, Bubenheim/Zellertal) verwendet, welche vor der Aussaat autoklaviert wird (vorher gut anfeuchten!). Sollen die Pflanzen bis zur Blüte kultiviert werden, werden die Samen *einzel*n auf die Erde gesetzt (dazu befeuchteten Zahnstocher verwenden), mit maximal 2 Samen pro Topf (10 x 10 x 11 cm). Sollen nur Keimlinge angezchtet werden, werden die Samen gleichmäßig auf die Erde gestreut, sodass die Samen einen Abstand von ca. 0,5 - 1 cm zueinander haben. Nach der Aussaat wird die Erde von unten mit Wasser gesättigt.

Um eine gleichzeitige Keimung zu gewährleisten, erfolgt eine Stratifikation bei 4°C und Dunkelheit für mindestens 3 Tage. Die Anzucht erfolgt bei konstanten Bedingungen bei 22°C und 16h/8h Licht/Dunkel-Rhythmus. Die Belichtungsstärke beträgt ca. 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Lichtquelle: Osram L36W/20 Cool White).

3.3.2 Sterilisation von *Arabidopsis*-Samen und Aussaat auf Agarplatten

Bevor die *Arabidopsis*-Samen auf Agar-Platten ausgesät werden, müssen sie sterilisiert werden. Sterilisation und Aussaat werden an der Sterilbank durchgeführt.

Material:

Arabidopsis-Samen

70% (v/v) Ethanol

dH₂O, steril

33% (v/v) Chlorbleiche (DanKlorix)

0,2% (w/v) Agar, steril

MS-Agarplatten [4,4 g/l Murashige and Skoog Basal Medium (M5519, Sigma); 1% Saccharose; 0,8% Agar; pH 6 (KOH)]; steril

Ca. 30 mg Samen werden in einem Reaktionsgefäß mit 200 µl 70% (v/v) Ethanol versetzt, kurz invertiert und dann sofort 600 µl steriles dH₂O zugegeben. Es werden sofort 600 µl Überstand abgesaugt und verworfen. Der Waschschrift mit dH₂O wird viermal wiederholt. Falls mehrere Samenproben sterilisiert werden, kann an dieser Stelle pausiert werden, bis alle Proben mit dH₂O gewaschen wurden. Nun werden 200 µl Chlorbleiche zugefügt und 5 Minuten einwirken lassen. Anschließend werden die Samen wieder wie oben beschrieben fünfmal mit 600 µl sterilem dH₂O gewaschen.

Zum Ausplattieren werden die sterilisierten Samen in 1,5 ml 0,2% Agar suspendiert. Die Suspension wird auf eine MS-Agarplatte pipettiert und die Samen so gleichmäßig wie möglich verteilt. Die Platte wird schließlich mit Parafilm verschlossen und zur Stratifikation mindestens 48 Stunden bei 4°C und dunkel gehalten.

3.3.3 Ergrünungsversuche

Arabidopsis-Samen von Wildtyp (WT)-Pflanzen und WSCP-*“knock-out“*-Mutanten (Δ WSCP) werden unter sterilen Bedingungen auf MS-Agarplatten (s. 3.3.2) ausgesät und nach einer 3-tägigen Stratifikation (bei 4°C) in einer Dunkelkammer bei 22°C zum Keimen gebracht. Die 4 Tage alten etiolierten Keimlinge werden bei einer Lichtintensität von $\sim 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Lichtquelle: Osram L36W/20 Cool White) zum Ergrünen gebracht und dabei in regelmäßigen Abständen die Chl-Fluoreszenz dokumentiert.

Die Dokumentation der Chl-Fluoreszenz findet in einer Dunkelkammer statt. Es wird eine auf einem Stativ befestigte Digitalkamera (Olympus CAMEDIA C-3040 Zoom) mit einem Rotfilter (R-64) vor dem Objektiv verwendet. Vor die zum Fotografieren verwendete Lichtquelle (Schott KL1500 electronic) wird ein Blaugrünfilter (BG7) fixiert.

3.3.4 Starklicht-Stressversuche

3.3.4.1 Mit adulten Pflanzen

Arabidopsis-Samen von Wildtyp (WT)-Pflanzen und WSCP-*“knock-out“*-Mutanten (Δ WSCP) werden unter Standardanzuchtsbedingungen (s. 3.3.1) ca. zwei Monate angezogen. Die adulten Pflanzen werden anschließend drei Tage lang mit einem 11 St./13 St. hell/dunkel-Rhythmus behandelt, mit einer Lichtintensität von $\sim 750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Starklicht; Lichtquelle: Osram Powerstar HQI-E400W/D) bzw. von $\sim 75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Kontrollpflanzen). Die Pflanzen werden täglich mit einer Digitalkamera dokumentiert.

3.3.4.2 Mit Keimlingen

Arabidopsis-Samen von Wildtyp (WT)-Pflanzen und WSCP-*“knock-out“*-Mutanten (Δ WSCP) werden ca. zwei Wochen lang unter Standardanzuchtsbedingungen (s. 3.3.1) angezogen.

Die Keimlinge werden anschließend vier Tage lang bei Schwachlichtbedingungen ($\sim 75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) gehalten und alle zwei Stunden mit einer 30-minütigen Starklichtphase ($\sim 750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) behandelt. Der Starklicht-„Puls“ wird anstelle von Dauer-Starklicht verwendet, um eine Anpassung an das Starklicht zu vermeiden. Die Kontrollpflanzen werden konstant bei Schwachlicht gehalten.

Vor Beginn des Versuchs ($t = 0$), sowie nach 24 St. und 96 St., werden ca. 3-5 Keimlinge abgeschnitten, in ein *vorgewogenes* Reaktionsgefäß gegeben, das Frischgewicht der Keimlinge bestimmt und dann sofort mit flüssigem N_2 schockgefroren. Aus diesen Pflanzen werden nach Beendigung des Versuchs die Pigmente extrahiert (s. 3.3.4.2.1) und mittels analytischer HPLC (s. 3.1.3.1) analysiert.

3.3.4.2.1 Extraktion der Pigmente aus Arabidopsis-Blattmaterial

Material:

flüssiger N_2
50 mM TrisHCl pH 7 (kalt)
2-Butanol
5 M NaCl
70% (v/v) Aceton, gepuffert mit 0,2 mM TrisHCl pH 7

Das Pflanzenmaterial wird im Reaktionsgefäß mit einem Plastikpistill unter flüssigem N_2 zermahlen und anschließend mit 300 μl kaltem 50 mM TrisHCl pH 7 versetzt und gut gevortext. Es werden 200 μl 2-Butanol zugegeben und wieder gut gevortext. Die Probe wird nun zur besseren Phasentrennung mit 100 μl 5 M NaCl versetzt, erneut gevortext und anschließend zentrifugiert (2 Min., RT, 14000 UpM, Tischzentrifuge). Die Butanolphase (oben) wird vorsichtig abgehoben und in ein *vorgewogenes* Reaktionsgefäß pipettiert. Die ursprüngliche Probe wird noch mal mit 100 μl 2-Butanol versetzt, gevortext und zentrifugiert wie oben beschrieben. Die zweite Butanolphase wird ebenfalls vorsichtig abgehoben, mit der ersten vereint und das Reaktionsgefäß erneut gewogen, um die Masse des Butanols zu bestimmen. Das genaue Butanolvolumen wird wie in 3.1.9.1.2 beschrieben bestimmt und die Probe mit dem 2-fachen Volumen 70% Aceton versetzt. Die Pigmentanalyse mittels analytischer HPLC erfolgt wie in 3.1.3.1 beschrieben.

4 Ergebnisse

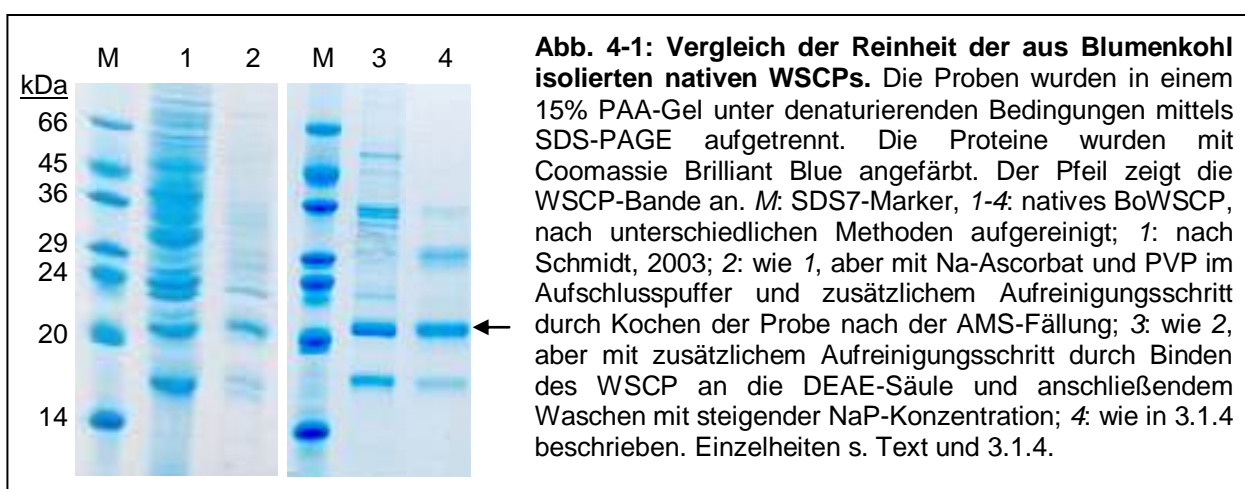
4.1 Biochemische Charakterisierung von WSCP

Ein wesentlicher Schwerpunkt dieser Arbeit war die Charakterisierung des WSCPs hinsichtlich seiner biochemischen Eigenschaften. Je besser das Protein diesbezüglich untersucht ist, desto eher kann man sich überlegen, zu welchen (z.B. technischen) Zwecken man es eventuell einsetzen könnte. Für die biochemische Charakterisierung war es erst einmal erforderlich, das native Protein aus Blumenkohl (*Brassica oleracea* var. *botrytis*, daher BoWSCP) zu isolieren sowie rekombinantes BoWSCP mit Pigmenten zu rekonstituieren um festzustellen, ob und wie sich natives und rekombinantes BoWSCP unterscheiden. Dazu wurden sie bezüglich ihres Pigment-zu-Protein-Verhältnisses, ihrer spektroskopischen Eigenschaften, ihres Oligomerisierungsgrades sowie ihrer Stabilität untersucht. Der Vergleich zwischen den beiden Proteinen wird in den entsprechenden Kapiteln behandelt.

4.1.1 Isolierung von nativem WSCP aus Blumenkohl

Die Isolierung von nativem WSCP aus Blumenkohl erfolgte wie in Schmidt (2003) beschrieben aus Blumenkohlblättern. Es handelte sich dabei um Blumenkohlblätter vom Markt. Die Mittelrippe der Blätter wurde entfernt. Aus 500 g solcher Blätter konnten ca. 4-5 mg WSCP isoliert werden.

Da bereits bekannt war, dass natives BoWSCP hitzestabil ist (Schmidt *et al.*, 2003), konnte die Reinheit des isolierten WSCPs erheblich verbessert werden durch zehnmütiges Kochen der Probe im Wasserbad bei 100°C und anschließender Zentrifugation, um die dadurch denaturierten Proteine zu entfernen (Abb. 4-1, Proben 2, 3 und 4).



In Abb. 4-1 sieht man vier Proben von nativem BoWSCP, die nach leicht unterschiedlichen Methoden isoliert und aufgereinigt wurden. Das native Blumenkohl-WSCP hat ein Molekulargewicht von ca. 21,5 kDa und ist somit zwischen der 20 und 24 kDa-Markerbande zu finden. Probe 1 wurde wie in Schmidt (2003) beschrieben isoliert und enthielt zwar das

native WSCP, war jedoch noch sehr stark mit anderen Proteinen aus Blumenkohl verunreinigt. Proben 2-4 wurden nach der AMS-Fällung gekocht, was deutlich die Reinheit verbesserte. Zusätzlich wurde bei diesen drei Proben zum Aufschlusspuffer Na-Ascorbat als Antioxidans und PVP zum Entfernen der bei der Isolierung störenden Polyphenole zugefügt, wie in Kamimura *et al.* (1997) beschrieben. Im Gegensatz zu Proben 1 und 2, bei denen sich das WSCP bei der Ionenaustauschchromatographie im Säulendurchfluss befand, wurde bei Probe 3 das WSCP während der Ionenaustauschchromatographie an die DEAE-Säule gebunden – dies erfolgte mit Hilfe einer niedrigen NaP-Konzentration (5 mM, im Gegensatz zu 100 mM bei Proben 1 und 2). Die Säule wurde anschließend mit einem Stufengradient mit steigender NaP-Konzentration gewaschen, bis das WSCP schließlich bei 100 mM NaP eluiert werden konnte.

Die höchste Reinheit wurde bei Probe 4 erhalten. Hier wurden noch mal einige Änderungen gegenüber Probe 3 eingeführt: dem Aufschlusspuffer wurde 0,1% mehr PVP zugesetzt, das Eluat der DEAE-Säule wurde vor der nativen PAGE mittels Ultrazentrifugation in einem Saccharosedichtegradienten und anschließend mit zwei verschiedenen Ultrafiltrationseinheiten (30 kDa MWCO und 100 kDa MWCO) weiter aufgereinigt. Trotz der aufwändigen Aufreinigungsprozedur war es jedoch nicht möglich, vollkommen reines BoWSCP zu gewinnen.

4.1.2 Rekombinantes Blumenkohl-WSCP – Optimierung der Rekonstitutionsbedingungen

Die Isolierung von nativem BoWSCP ist eine zeitaufwändige Prozedur, das Endprodukt war trotz Hitzebehandlung nie vollkommen rein (s. 4.1.1) und die erhaltene Menge WSCP war für viele der nachfolgenden Versuche nicht ausreichend. Daher musste eine Methode etabliert werden, mit der rekombinantes BoWSCP in großer Menge erhalten und mit großer Ausbeute rekonstituiert und aufgereinigt werden konnte. Das rekombinante Protein trägt N-terminal einen Hexahistidylrest und wird daher im Folgenden als BoWSCP_{His} bezeichnet.

4.1.2.1 Rekonstitutionsversuche mit Inclusion Bodies (IBs) von BoWSCP_{His}

Für viele rekombinante Proteine werden nach der Überexpression die Inclusion Bodies (IBs) verwendet, um das Protein zu rekonstituieren, da diese meistens sehr rein sind und sich somit weitere Aufreinigungsschritte erübrigen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dies zunächst auch versucht, in Anlehnung an die für rekombinantes BoWSCP verwendeten Rekonstitutionsmethoden aus Schmidt (2003).

Weder mit in GuHCl, Harnstoff noch in SDS gelösten IBs unter Verwendung von Rekonstitutionsmethoden nach Schmidt (2003) war ein nennenswerter Rekonstitutionserfolg zu erreichen. Auch Abwandlungen dieser Rekonstitutionsansätze durch den Versuch, die gelösten IBs über ihren Hexahistidylrest an eine Ni-Säule zu binden und anschließend mit Pigmenten zu rekonstituieren blieben ohne nennenswerten Erfolg. Das Hauptproblem bei dieser Rekonstitutionsvariante war die schlechte Bindung des aus den IBs solubilisierten WSCPs an die Säule, sowie die Aggregation des an die Säule gebundenen Proteins. Meistens schien mindestens die Hälfte des aus den IBs solubilisierten WSCPs gar nicht an die Säule zu binden und befand sich somit im Säulendurchfluss, und von dem Anteil, der an

die Säule gebunden hatte, war noch mal der größte Teil anscheinend auf der Säule aggregiert, sodass dieser Anteil nicht ohne denaturierende Maßnahmen von der Ni-Säule eluiert werden konnte. Schließlich konnte noch beobachtet werden, dass aus IBs rekonstituiertes WSCP stark zu Aggregation neigt, sodass es nicht lange gelagert werden konnte – bei -20°C erfolgte sogar eine vollständige Aggregation. Einmal aggregiertes rekombinantes WSCP konnte auch nicht mehr renaturiert werden – die Aggregate konnten nur noch in denaturierenden Reagenzien wie SDS, GuHCl oder NaOH gelöst werden.

Aufgrund der erheblichen Probleme, rekombinantes WSCP aus den IBs zu rekonstituieren, wurde für alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit rekombinantem WSCP das aus löslichem WSCP rekonstituierte Protein verwendet (s. 4.1.2.2).

4.1.2.2 Rekonstitutionsversuche mit löslichem BoWSCP_{His}

WSCP ist ein wasserlösliches Protein, und das rekombinante Protein wurde somit vom *E.coli*-Wirtstamm nicht nur als unlösliche IBs, sondern auch als lösliches Protein in der Bakterienzelle überexprimiert. Nach Zellaufbruch in der *French Press* und anschließendem Abzentrifugieren der IBs und weiteren unlöslichen Zellbestandteilen befindet sich das lösliche BoWSCP_{His} im Überstand (zusammen mit allen löslichen bakteriellen Proteinen). Ein Vorteil gegenüber den IBs ist die Tatsache, dass das lösliche WSCP schon weitestgehend richtig gefaltet vorliegt. Im Gegensatz zu den IBs ließ sich das lösliche rekombinante WSCP somit problemlos mit Pigmenten rekonstituieren, sowohl in Lösung als auch über seinen Hexahistidylrest immobilisiert auf einer Ni-Säule.

Über Änderung der Überexpressionsbedingungen konnte das Verhältnis von löslichem WSCP zu IBs verbessert und somit die Ausbeute an löslichem WSCP erhöht werden. Das Herabsetzen der Expressionstemperatur führt in der Regel zu einer langsameren Expression und Erhöhung des Anteils an löslichem rekombinantem Protein (Baneyx, 1999). Hier wurde außerdem festgestellt, dass eine längere Expressionsdauer (über Nacht) ebenfalls die Ausbeute an löslichem WSCP erhöhte. In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse hierzu zusammengefasst:

Probe WSCP	28	28Ü	37
löslich (mg)	20,0	40,0	18,0
IBs (mg)	34,6	49,4	38
löslich/IBs	0,58	0,81	0,47

Tab. 4-1: Vergleich der Ausbeuten an BoWSCP_{His} unter verschiedenen Überexpressionsbedingungen. BoWSCP_{His} wurde in *E. coli* JM101 bei verschiedenen Temperaturen und unterschiedlicher Expressionsdauer exprimiert. Dargestellt ist die jeweilige Ausbeute an löslichem BoWSCP_{His} und unlöslichen BoWSCP_{His}-IBs aus 500 ml Bakterienkultur. Grau hinterlegt ist das beste Ergebnis. 28: Expression bei 28°C für 4 St., 28Ü: Expression bei 28°C über Nacht (~ 20 St.), 37: Expression bei 37°C für 4 St.

Wie in Tab. 4-1 zu sehen ist, wurde die höchste Ausbeute an löslichem WSCP sowie das beste Verhältnis von löslichem WSCP zu IBs bei 28°C und Expression über Nacht erzielt.

In dieser Arbeit wurde die Rekonstitution des löslichen WSCPs mit Chl auf einer Ni-Säule als Standardrekonstitutionsmethode etabliert und angewandt, da hier – im Gegensatz zur

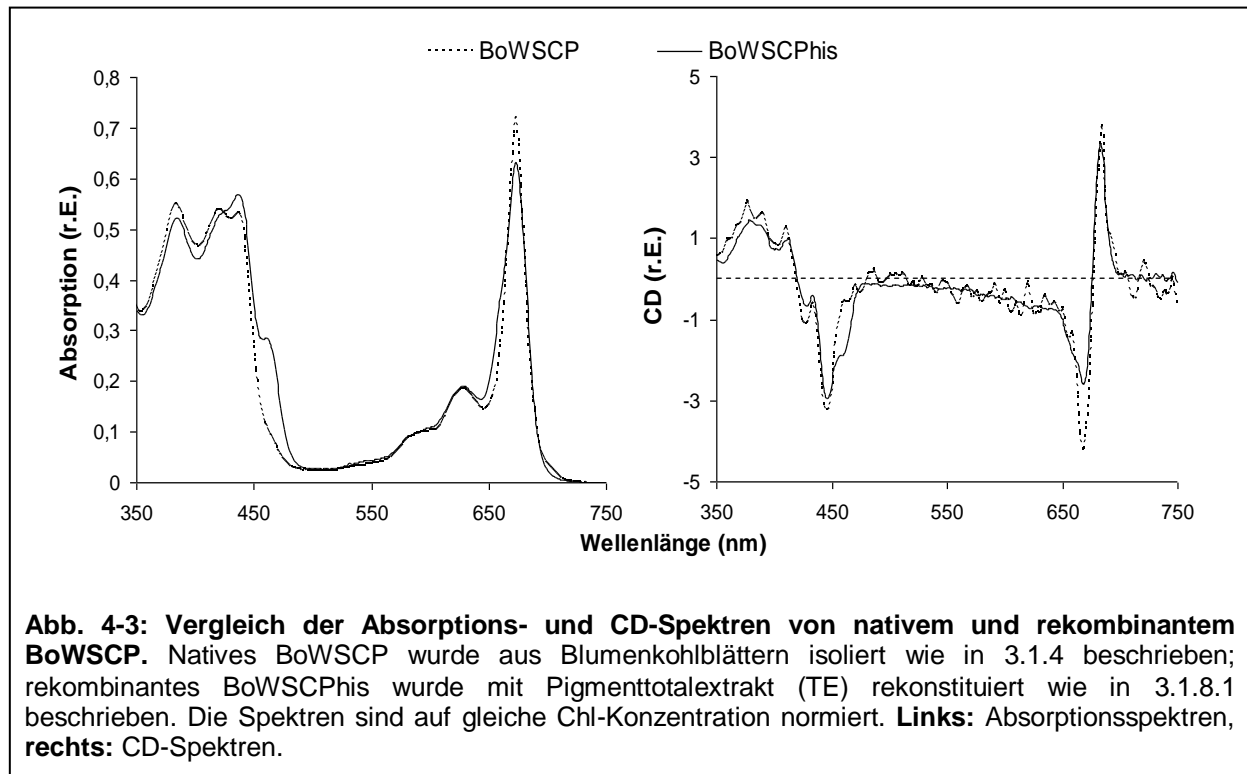
Rekonstitution in Lösung – gleichzeitig eine effiziente Aufreinigung des Proteins erfolgte (vgl. 4.1.2.2.1). Die Ausbeute lag dabei bei etwa 60-80%, mit dem neuen Klon mBoWSCPhis (s. 4.1.3) sogar höher. Die Rekonstitutionsmethode basiert auf der in Schmidt (2003) beschriebenen Methode, wurde jedoch weiter optimiert, um vor allem die Reinheit des Produktes zu verbessern. So wurde das Säulenmaterial bei allen Waschschrritten kräftig aufgeschlämmt, da sich herausstellte, dass hierdurch – bei gleichem Waschvolumen im Vergleich zur ursprünglichen Methode – gründlicher gewaschen wurde. Des Weiteren wurde ein zusätzlicher Waschschrritt mit einem imidazolhaltigen Puffer direkt vor der Elution eingeführt (W4 in Abb. 4-2), was die Verunreinigung des Eluats mit bakteriellen Proteinen erheblich senkte.

In Abb. 4-2 ist das WSCP-Protein bei ca. 23 kDa zu sehen. Die höchste Reinheit konnte mit dem im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Klon mBoWSCPhis erzielt werden (Abb. 4-2 c)), der in seiner Aminosäuresequenz dem muren nativen BoWSCP entspricht und somit gegenüber dem bisher verwendeten Klon BoWSCPhis (Abb. 4-2 a) und b)) um 10 C-terminale Aminosäuren verkürzt ist. Da der ursprüngliche Vollängenklon, BoWSCPhis, stärker zur Aggregation neigt als mBoWSCPhis (vgl. hierzu auch 4.1.3), kann man in Abb. 4-2 a) (BoWSCPhis) – trotz der denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE – eine WSCP-Dimerbande bei ca. 45 kDa erkennen, die in Abb. 4-2 c) (mBoWSCPhis) fehlt. Dass es sich bei 45 kDa tatsächlich um eine WSCP-Bande handelt wurde mittels Western Blot mit einem WSCP-Antikörper überprüft (Daten nicht gezeigt).



Wie bereits erwähnt war es wichtig zu überprüfen, ob und in wieweit sich das rekombinante WSCP vom nativen WSCP unterscheidet. Dazu wurden von dem Rekonstitutionsprodukt als erstes ein Absorptions- und ein CD-Spektrum gemessen, da diese Auskunft geben über die

Pigmentausstattung und die Anordnung der Pigmente zueinander im Pigment-Protein-Komplex.



Wie man in Abb. 4-3 sieht, sind sich die Absorptions- und CD-Spektren des rekombinanten und des nativen BoWSCP zwar sehr ähnlich, sie weisen jedoch auch deutliche Unterschiede auf. Man sieht bei beiden, dass die Lage der Maxima (und Minima bei den CD-Spektren) nahezu identisch ist – die Absorptionsmaxima liegen bei 384, 421, 437, 629 und 673 nm (± 1 nm) und zeigen somit große Übereinstimmung mit den Literaturwerten für natives Blumenkohl-WSCP (Nishio und Satoh, 1997); bei den CD-Spektren liegen die Hauptminima bei 446 und 668 nm und lediglich die Lage des Hauptmaximums unterscheidet sich um 2 nm – bei nativem BoWSCP liegt es bei 685 nm und bei rekombinatem BoWSCP bei 683 nm. Die beiden CD-Signale im q_y -Bereich zeigen eine hohe Symmetrie, vor allem beim nativen WSCP.

Vergleicht man die Spektren bezüglich ihrer Gesamtform, sind einige Unterschiede festzustellen. Bei den Absorptionsspektren (Abb. 4-3, links) sieht man, dass die Höhe des Absorptionsmaximums sich unterscheidet – bei Normierung auf gleiche Chl-Konzentration ist es niedriger beim rekombinanten Protein, die q_y -Bande ist hier gleichzeitig breiter als bei nativem WSCP. Im Soret-Bereich sieht man bei rekombinatem WSCP eine deutliche Schulter bei 460 nm, die beim nativen Protein fehlt. Des Weiteren unterscheiden sich in diesem Bereich die Verhältnisse der Absorptionsmaxima zueinander. Beim Betrachten der CD-Spektren (Abb. 4-3, rechts) fällt ebenfalls beim rekombinanten WSCP eine Schulter bei 460 nm auf, die beim nativen WSCP fehlt. Analog zu den Absorptionsspektren zeigt sich beim rekombinanten Protein auch wieder im q_y -Bereich eine niedrigere Amplitude bei gleichzeitiger Verbreiterung der Absorptionsbande.

Die HPLC-Analyse der Pigmentausstattung der beiden Pigment-Protein-Komplexe ergab, dass das native BoWSCP ein Chl-*a/b*-Verhältnis von knapp 8 hatte, rekombinantes WSCP, welches mit Pigmenttotalextrakt (Chl *a/b* ~ 3) rekonstituiert wurde, jedoch ein weitaus geringeres Chl-*a/b*-Verhältnis von ca. 3 besaß. Der Grund für den weitaus geringeren Chl-*a*-Gehalt des mit TE rekonstituierten Proteins, sowie die Auswirkungen des Chl-*a/b*-Verhältnisses auf die spektroskopischen Eigenschaften werden ausführlicher in den Kapiteln 4.1.5 bzw. 4.1.6.2 erörtert.

4.1.2.2.1 Vergleich verschiedener Rekonstitutionsmethoden mit löslichem BoWSCP_{His}

Wie unter 4.1.2.2 beschrieben ließ sich das lösliche WSCP aus dem „French Press“-Überstand (FPÜ) am besten rekonstituieren. Dabei gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Rekonstitutionsausbeuten einer Rekonstitution in Lösung und einer Rekonstitution des immobilisierten Proteins auf einer Ni-Säule. Trotzdem wurde die Rekonstitution auf der Ni-Säule bevorzugt, da bei der Rekonstitution in Lösung das Produkt noch stark mit bakteriellen Proteinen aus dem FPÜ verunreinigt war, wie nachstehend beschrieben wird.

Bei der Rekonstitution in Lösung, bei der einfach der FPÜ unter Detergenzugabe mit einem Pigmentüberschuss vermischt wurde, wurden verschiedene Varianten für die anschließende Aufreinigung (Abtrennung von freiem Pigment sowie Fremdprotein) ausprobiert, und zwar 1) Ultrazentrifugation (UZ) in einem Saccharosedichtegradienten, 2) native Gelelektrophorese und 3) native Gelelektrophorese mit anschließendem Kochen der Probe. In Abb. 4-4 sieht man ein Coomassie-gefärbtes PAA-Gel, auf dem die verschiedenen Rekonstitutionsansätze bezüglich ihrer Reinheit verglichen werden. Dabei wird deutlich, dass nur zwei der vier Proben nicht mit bakteriellen Proteinen kontaminiert sind: die Probe, die auf der Ni-Säule rekonstituiert wurde und diejenige, die in Lösung rekonstituiert und nach der Auftrennung mittels nativer PAGE gekocht wurde. Vergleicht man Bahn 3 und 4, so ist zu erkennen, dass die Reinheit der mittels nativer PAGE aufgetrennten Probe durch Kochen der Lösung erheblich verbessert werden konnte, da Chl-WSCP hitzestabil ist (s. 4.1.7.1).

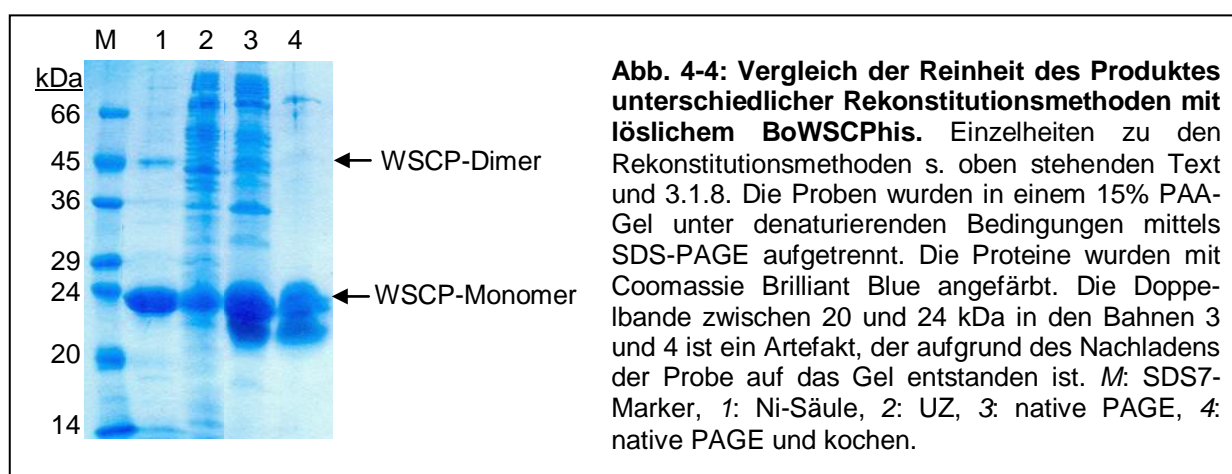


Abb. 4-4: Vergleich der Reinheit des Produktes unterschiedlicher Rekonstitutionsmethoden mit löslichem BoWSCP_{His}. Einzelheiten zu den Rekonstitutionsmethoden s. oben stehenden Text und 3.1.8. Die Proben wurden in einem 15% PAA-Gel unter denaturierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Die Doppelbande zwischen 20 und 24 kDa in den Bahnen 3 und 4 ist ein Artefakt, der aufgrund des Nachladens der Probe auf das Gel entstanden ist. M: SDS7-Marker, 1: Ni-Säule, 2: UZ, 3: native PAGE, 4: native PAGE und kochen.

Für die weiteren Versuche wurde jedoch lieber die aufwändigere Rekonstitution auf der Ni-Säule durchgeführt und somit ein reines Produkt ohne Hitzebehandlung erhalten, da nicht bekannt ist, inwiefern das Kochen der Probe möglicherweise die Proteineigenschaften beeinflusst und somit nachfolgende Versuche verfälschen könnte. Ein weiterer Vorteil der Rekonstitution auf der Ni-Säule ist die Tatsache, dass das Produkt in konzentrierter Form von der Säule eluiert werden kann. Bei den beiden Proben, die in Abb. 4-4 in Bahn 3 und 4 zu sehen sind war die Proteinlösung nach Extraktion des Rekonstitutionsprodukts aus dem Gel so stark verdünnt, dass das Probenvolumen für die Geltaschen zu groß war und ein Nachladen erforderlich machte, um vergleichbare Proteinmengen auf das Gel auftragen zu können – dadurch entstanden Doppelbanden als Artefakt. Dies wäre nur zu verhindern gewesen durch ein zeitaufwändiges Aufkonzentrieren der Proben mittels z.B. Ultrafiltration.

4.1.3 Der neue Klon mBoWSCPhis

Zu Beginn dieser Arbeit wurde der bereits vorhandene WSCP-Klon BoWSCPhis verwendet, der im Rahmen der Dissertation von Kristin Schmidt (2003) hergestellt wurde. Dabei handelt es sich um ein Protein mit der Vollängensequenz des nativen Blumenkohl-WSCPs und einem N-terminalen Hexahistidylrest. Da dieses rekombinante Protein jedoch zu Aggregation neigt, im Gegensatz zum nativen BoWSCP, wurde versucht, die Ursache hierfür zu ermitteln. Ein Hydrophobizitätsplot ergab, dass der C-Terminus der WSCP-Sequenz hydrophobe Eigenschaften besitzt (Gundlach, 2006 (Diplomarbeit)); auch Satoh *et al.* (1998) beschreiben diesen Bereich als hydrophob. Unter Anleitung der Autorin wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Kristina Gundlach (2006) der WSCP-Klon C Δ 20 hergestellt, dem die 20 C-terminalen Aminosäuren fehlen. Dieser erwies sich als viel löslicher als der Vollängenklon und zeigte keine Aggregationsprobleme. Da in der Literatur beschrieben ist, dass beim nativen muren WSCP aus Blumenkohl die 10 C-terminalen Aminosäuren abgespalten sind (Satoh *et al.*, 1998), wurde ein entsprechender Klon im Rahmen dieser Arbeit hergestellt, der als mBoWSCPhis bezeichnet wurde (für „matures“ BoWSCPhis).

Der neue Klon zeigt weit weniger Aggregationsprobleme als BoWSCPhis und wurde von vornherein von den Bakterien zu einem weitaus größeren Anteil als lösliches Protein exprimiert, nicht als unlösliche IBs. Da er sich in seinen spektroskopischen Eigenschaften nicht vom Vollängenklon unterscheidet, wurde in späteren Versuchen nur noch mWSCPhis verwendet.

4.1.4 Bestimmung des Chl/Protein-Verhältnisses

In der Literatur ist für WSCP aus Blumenkohl ein Chl-zu-Protein-(Chl/Protein-)Verhältnis von 0,5 beschrieben, d.h. es befinden sich 2 Chlorophylle in einem Tetramer (Satoh *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 2003). Insgesamt gibt es jedoch Angaben über 1 Chl pro Tetramer (WSCP aus Rosenkohl (*Brassica oleracea* L. var. *gemmifera*), Kamimura *et al.*, 1997) bis hin zu 4 Chl pro Tetramer (WSCP aus der Virginischen Gartenkresse (*Lepidium virginicum*), Murata und Ishikawa, 1981).

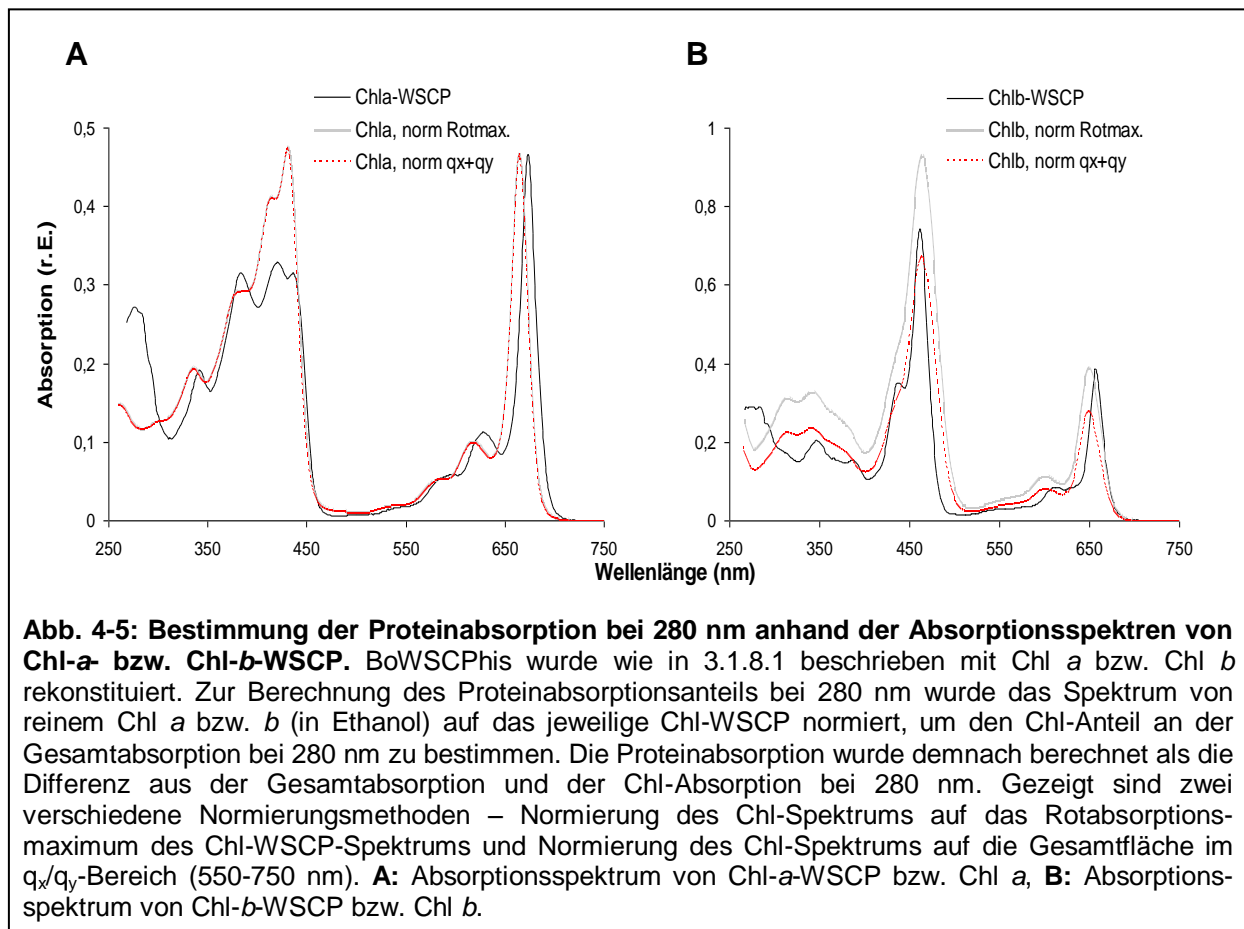
Die möglichst genaue Bestimmung des Chl/Protein-Verhältnisses war ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit, da das Ergebnis einen Einfluss auf die Interpretation einiger Versuche hatte. Um die gebundenen Chlorophylle zu quantifizieren, wurden die Pigment-Protein-Komplexe

erst denaturiert und anschließend die Pigmente mit Butanol quantitativ extrahiert (s. 3.1.9.1.2) und mittels analytischer HPLC quantifiziert. Bei dieser Methode gab es oft das Problem, dass die Chlorophylle so stark vom Protein gebunden wurden, dass sie nicht vollständig extrahiert werden konnten. Wenn, um dieses Problem zu beheben, die Proteine stärker denaturiert wurden (z.B. durch Einführen einer Hitzebehandlung nach SDS-Zugabe), wurden oftmals die Pigmente zu stark geschädigt, so dass sie in der HPLC-Analyse nicht eindeutig identifizierbar und quantifizierbar waren. Dennoch erwies sich dies als die genaueste Methode um die Pigmente zu bestimmen.

Auch die Quantifizierung des Proteins war schwierig. Da die gebundenen Chlorophylle auch im UV-Bereich absorbieren (s. hierzu auch 4.1.6.1), konnte die Proteinkonzentration nicht einfach mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten durch Bestimmen der Proteinabsorption bei 280 nm ermittelt werden. Da aber andere Quantifizierungsmethoden, wie z.B. Extraktion der Chlorophylle mit anschließendem Fällen der Proteine und dann Bestimmen der Proteinkonzentration mittels verschiedener Methoden (A_{280} -Messung, BCA-Assay, BioRad-Assay), nicht übereinstimmende Ergebnisse lieferten und außerdem bei Proteinfällungen ein Probenverlust unvermeidbar ist, wurde schließlich doch auf die A_{280} -Bestimmung bei den pigmentierten WSCP-Komplexen zurückgegriffen. Allerdings musste natürlich der Beitrag der Chlorophylle zur Absorption bei 280 nm berücksichtigt werden und es war schwierig, diesen genau zu bestimmen (s.u.).

Die Proteinbestimmung wurde demnach durch Messen eines vollständigen Absorptionsspektrums (im sichtbaren und UV-Bereich, 750-250 nm) der Chl-WSCP-Komplexe und anschließender A_{280} -Bestimmung des Proteins durch Subtraktion des Chl-Anteils der Gesamtabsorption bei 280 nm durchgeführt. Dazu wurde das Chl-*a/b*-Verhältnis in den Chl-WSCP-Komplexen durch Pigmentextraktion und anschließender HPLC-Analyse bestimmt, dann die Spektren von reinem Chl *a* bzw. *b* (in Ethanol) in diesem Verhältnis rechnerisch addiert und das resultierende Spektrum auf die Rotabsorption des gemessenen Chl-WSCP-Spektrums normiert. Obwohl die Lage des Rotabsorptionsmaximums des freien Chlorophylls nicht mit der Lage des Rotmaximums des Chl-WSCP-Komplexes übereinstimmt, wurde für die Normierung das Chl-Spektrum nicht verschoben, da sonst alle anderen Maxima mitverschoben würden. In Abschnitt 4.1.6.1 wurde aber ermittelt, dass die Bindung an WSCP keinen Einfluss auf die Chl-Absorption bei 280 nm zu haben scheint – somit ist eine signifikante Verschiebung des Chl-Spektrums in diesem Bereich nach Proteinbindung unwahrscheinlich. Schließlich konnte dann der Chl-Absorptionsanteil bei 280 nm subtrahiert werden und der daraus ermittelte A_{280} -Wert mit dem molaren Extinktionskoeffizienten des WSCP-Apoproteins verrechnet werden, um die Proteinkonzentration zu ermitteln.

In der nachfolgenden Abbildung ist am Beispiel von Chl-*a*-WSCP und Chl-*b*-WSCP eine solche Normierung zur Bestimmung der Proteinabsorption bei 280 nm dargestellt. Dabei wurde das Chl-Spektrum einmal auf das Rotabsorptionsmaximum des Chl-WSCP-Komplexes normiert und alternativ auf die Gesamtabsorption im q_x/q_y -Bereich normiert. Die zweite Normierungsmethode ist vor allem für Chl-*b*-WSCP zur Bestimmung des Chl-Anteils an A_{280} empfehlenswert, wie weiter unten erörtert wird.



Wie man in Abb. 4-5 erkennen kann, gibt es bezüglich der Normierung auf das Rotabsorptionsmaximum des Chl-WSCP-Komplexes einen erheblichen Unterschied zwischen Chl a und Chl b. Für Chl-a-WSCP funktioniert diese Normierungsmethode gut – der Chl-a-Anteil an der Absorption bei 280 nm beträgt ca. 44% und ist somit nahe an dem in 4.1.6.1 errechneten Wert von 41%, welcher jedoch für Chl a bzw. Chl-a-WSCP in OG-Puffer gilt (hier: NaP/Imidazol-Puffer (Elutionspuffer)) und somit nicht unbedingt direkt vergleichbar ist. Dabei gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen dieser Methode und einer alternativen Normierung auf die Gesamtfläche im q_x/q_y -Bereich – die genauen Werte sind in Tab. 4-2 zu sehen. Bei Chl-b-WSCP sieht man, dass bei einer Normierung des Chl-b-Spektrums auf das Rotmaximum von Chl-b-WSCP der Chl-b-Anteil am Gesamtspektrum und somit auch am A_{280} -Wert überschätzt wird. Der Chl-b-Anteil an der Gesamtabsorption bei 280 nm beträgt hier ca. 64% und weicht somit sehr stark von dem in 4.1.6.1 errechneten Wert von 39% ab. Normiert man hier jedoch stattdessen auf die Gesamtabsorption in der q_x/q_y -Region, ergibt sich für den Chl-b-Anteil an A_{280} ein Wert von ca. 46%, der vergleichbar mit dem Wert für Chl a ist.

Anzumerken ist noch, dass in Abschnitt 4.1.6.1 beschrieben ist, dass sich bei Chl a die Absorption im q_x/q_y -Bereich insgesamt um ca. 6,8% verringert nach Bindung an WSCP. Berechnet man diese 6,8% Verringerung der Absorption bei der Normierung des Chl-a-Spektrums auf den q_x/q_y -Bereich des Chl-a-WSCP-Spektrums mit ein, wird das Chl-a-Spektrum jedoch etwas unterrepräsentiert. Die Werte für den relativen Anteil der Chl-

Absorption an der Gesamtabsorption bei 280 nm verringern sich dabei um höchstens 3% und liegen somit noch innerhalb der Schwankungsbreite der ohne Berücksichtigung der 6,8% berechneten Werte (vgl. Werte für Chl-a-WSCP in Tab. 4-2). Zudem gilt eine Verringerung der Chl-Absorption im q_x/q_y -Bereich nur für rein Chl-a-haltige WSCPs und nicht für WSCP-Komplexe, die daneben auch Chl *b* enthalten. Daher wurden die 6,8% bei der Normierung auf den q_x/q_y -Bereich nicht berücksichtigt.

In folgender Tabelle sieht man einen Vergleich zwischen den mit den beiden Normierungsmethoden errechneten Ergebnissen. Beide Methoden wurden an unterschiedlich pigmentierten Chl-WSCP-Komplexen angewendet, um jeweils den Chl-Anteil an der Gesamtabsorption bei 280 nm zu bestimmen.

Tab. 4-2: Vergleich der Normierungsmethoden zur Bestimmung des Chl-Anteils an der Absorption von Chl-WSCP-Komplexen bei 280 nm. Es wurden Absorptionsspektren (750-250 nm) von unterschiedlich pigmentierten BoWSCP-Phis-Komplexen gemessen und anschließend mittels zwei verschiedener Methoden der Chl-Anteil an der Absorption der Chl-WSCP-Komplexe bei 280 nm bestimmt (vgl. Abb. 4-5). Einerseits wurde das Absorptionsspektrum von freiem Chl (in Ethanol) auf das Rotabsorptionsmaximum von Chl-WSCP normiert (Spalte: *Norm Rotmax*), andererseits wurde das Chl-Spektrum auf die Fläche im q_x/q_y -Bereich des Chl-WSCP-Spektrums normiert (Spalte: *Norm q_x+q_y*). Anschließend wurde der A_{280} -Wert des Chl-Spektrums durch den A_{280} -Wert des Chl-WSCP-Spektrums geteilt und mit 100 multipliziert, um den prozentualen Anteil des Pigments an der Gesamtabsorption bei 280 nm zu berechnen. Die grau hinterlegten Werte weichen deutlich von den anderen Werten ab. *Chl a/b*: Chl-a/b-Verhältnis im Chl-WSCP-Komplex, mittels HPLC-Analyse bestimmt; *MW*: Mittelwert; *SD*: Standardabweichung; *Min/Max*: minimaler und maximaler Wert; *k.A.*: keine Angabe möglich (es wurde keine quantitative Chl-Bestimmung durchgeführt).

Chl a/b	Chl-Anteil (%) an A_{280}		Chl/Protein	
	Norm Rotmax	Norm q_x+q_y	Norm Rotmax	Norm q_x+q_y
a	44	44	0,47	0,40
a	42	42	0,60	0,51
a	38	39	0,55	0,47
3,1	34	39	0,58	0,53
3,0	39	46	k.A.	k.A.
3,0	41	44	k.A.	k.A.
3,0	36	38	k.A.	k.A.
3,0	36	40	k.A.	k.A.
3,0	40	42	0,59	0,53
2,7	38	44	k.A.	k.A.
2,5	41	43	k.A.	k.A.
2,0	35	40	0,67	0,62
b	64	46	1,45	0,83
b	57	43	1,01	0,64
MW (SD)	41,8 (8,2)	42,1 (2,6)	0,74 (0,31)	0,57 (0,12)
Min/Max	34 / 64	38 / 46	0,47 / 1,45	0,40 / 0,83

Der Chl-Anteil an der Gesamtabsorption der Chl-WSCP-Komplexe bei 280 nm (linke Tabellenhälfte) ist im Mittel bei beiden Normierungsmethoden fast gleich und liegt bei ca. 42%. Betrachtet man aber jeweils den minimal und maximal berechneten Wert, so fällt auf, dass diese Werte bei Normierung auf das Rotmaximum der Spektren sehr weit auseinander liegen, was sich in einer höheren Standardabweichung für die mit dieser Methode berechneten Werte auswirkt. Der Grund dafür liegt vor allem an den stark abweichenden Ergebnissen für Chl *b* (grau hinterlegt). Für Chl-*b*-WSCP kann diese Normierungsmethode demnach nicht angewendet werden.

Bei den drei mit Chl *a* pigmentierten WSCP-Komplexen zeigen sich, wie erwartet (vgl. Abb. 4-5), keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Normierungsmethoden, allerdings weichen hier die Ergebnisse innerhalb der jeweiligen Normierungsmethode voneinander ab. So liegt für Chl-*a*-WSCP der prozentuale Anteil des Pigments an der Gesamtabsorption bei 280 nm zwischen 38% (bzw. 39% bei Normierung auf den q_x/q_y -Bereich) und 44%. Diese Schwankungen sind vermutlich durch eine unterschiedliche Reinheit der Proben bedingt – eine Verunreinigung mit Fremdprotein (z.B. bakteriellen Proteinen aus der Überexpression des rekombinanten WSCPs) erhöht die Gesamtabsorption bei 280 nm und vermindert so den relativen Anteil der Chl-Absorption in diesem Bereich. Bei der Chl-*a*-WSCP-Probe mit dem niedrigsten errechneten Chl-Anteil von 38-39% an A_{280} handelte es sich tatsächlich um das Volllängenprotein, BoWSCP_{His}, welches trotz der Aufreinigung über eine Ni-Säule meistens noch ein wenig mit bakteriellen Proteinen verunreinigt war, im Gegensatz zu dem C-terminal verkürzten Klon mBoWSCP_{His} (vgl. Abb. 4-2 a) und c)). Die anderen beiden in Tab. 4-2 aufgeführten Chl-*a*-WSCP-Proben wurden mit mBoWSCP_{His} hergestellt. Bei den Chl-*a/b*-haltigen WSCP-Komplexen, die hier untersucht wurden, hat sich jedoch kein direkter Zusammenhang zwischen dem verwendeten WSCP-Klon und dem errechneten Chl-Anteil an der Absorption bei 280 nm ergeben; hier spielen vermutlich noch andere Faktoren bei den Schwankungen der Werte eine Rolle. Insgesamt fällt noch auf, dass bei Chl-*a/b*-WSCP – unabhängig vom Chl-*a/b*-Verhältnis – alle mit der Normierung auf den q_x/q_y -Bereich berechneten Werte für den Chl-Anteil an A_{280} etwas höher liegen als die mit der Normierung auf das Rotmaximum berechneten Werte.

Beim den errechneten Chl/Protein-Verhältnissen in Tab. 4-2 (rechte Tabellenhälfte) zeigt sich wieder, dass die Normierung auf das Rotmaximum nur bedingt anwendbar ist, da sich hier für die Chl-*b*-WSCP-Proben Werte > 1 ergeben. Da jedes WSCP-Monomer jedoch nur eine Chl-Bindungsstelle besitzt kann das Chl/Protein-Verhältnis höchstens den Wert 1 annehmen. Voraussetzung ist natürlich, dass die WSCP-Proben nicht mit freiem Pigment verunreinigt sind – solch eine Verunreinigung ist bei den hier untersuchten Proben aufgrund der Stringenz der Rekonstitutionsmethode (s. 3.1.8.1) ausgeschlossen.

Wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration das Chl-Spektrum auf das Rotmaximum des Chl-WSCP-Spektrums normiert, ergeben sich für das berechnete Chl/Protein-Verhältnis wieder große Abweichungen zwischen den einzelnen Proben und somit auch wieder eine sehr hohe Standardabweichung. Bei Normierung des Chl-Spektrums auf den q_x/q_y -Bereich weichen lediglich die Werte der stark Chl-*b*-haltigen Proben von den anderen Werten ab. Lässt man bei der Berechnung des Mittelwerts und der Standardabweichung aber jeweils die letzten drei Proben außer Acht (WSCP mit Chl *a/b* = 2 und Chl-*b*-WSCP) und betrachtet somit nur diejenigen Chl-WSCP-Komplexe, die ein Chl-*a/b*-Verhältnis ≥ 3 besitzen, ergibt

sich ein durchschnittliches Chl/Protein-Verhältnis von 0,56 (+/- 0,05) bzw. 0,49 (+/- 0,05) für die Normierungsmethode auf das Rotmaximum bzw. auf den q_x/q_y -Bereich, entsprechend zwei Chlorophyllen pro WSCP-Tetramer. Diese Werte stimmen demnach mit den Literaturwerten (Satoh *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 2003) für das Chl/Protein-Verhältnis von Blumenkohl-WSCP überein, vor allem der mit der Chl-Normierung auf den q_x/q_y -Bereich bestimmte Wert.

Nicht zu vergessen ist, dass das errechnete Chl/Protein-Verhältnis nicht nur von der Wahl der Chl-Normierungsmethode zur Bestimmung der korrekten Proteinkonzentration abhängt, sondern auch von der korrekten Bestimmung der Chl-Konzentration mittels HPLC-Analyse. Wie bereits oben erwähnt kam es hierbei immer wieder zu Problemen, vor allem bei der Vollständigkeit der Chl-Extraktion aus den Pigment-Protein-Komplexen. Eine nicht vollständige Extraktion des Pigments kann in zu niedrigen Werten für das Chl/Protein-Verhältnis resultieren, wie es z.B. bei der ersten Chl-*a*-WSCP-Probe in Tab. 4-2 der Fall ist.

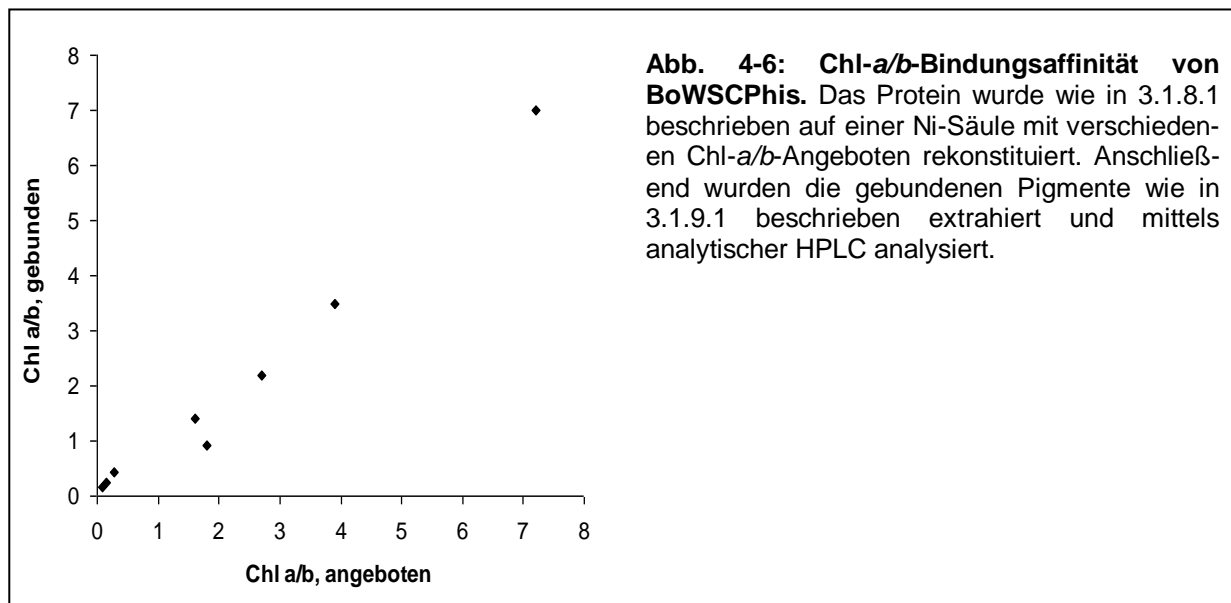
Zusammenfassend lässt sich folgendes sagen: zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Chl-WSCP-Komplexen anhand ihrer Absorptionsspektren und des Absorptionsspektrums freien Chlorophylls, funktioniert die Methode, bei der das Chl-Spektrum auf das Rotabsorptionsmaximum des Chl-WSCP-Spektrums normiert wird, nur gut mit rein Chl-*a*-haltigen WSCP-Komplexen bzw. bei denen, die einen höheren Chl-*a*- als Chl-*b*-Anteil haben. Bei rein Chl-*b*-haltigen WSCP-Komplexen wird mit dieser Methode der Chl-Anteil im Spektrum überschätzt, da sich das Rotabsorptionsmaximum von Chl *b* nach Bindung an das Protein erhöht (s. 4.1.6.1). Normiert man also das Spektrum des freien Chl *b* auf das Rotmaximum des Chl-*b*-WSCP, so wird es mit einem zu hohen Faktor multipliziert und somit auch der Chl-*b*-Anteil bei 280 nm zu hoch berechnet.

Sowohl für Chl-*a*- als auch für Chl-*b*-WSCP ergibt die Normierung des Chl-Spektrums auf den q_x/q_y -Bereich des Chl-WSCP-Spektrums vergleichbare Werte für den prozentualen Anteil der Chl-Absorption an der Gesamtabsorption bei 280 nm. Sie ist somit die empfehlenswertere Normierungsvariante. Bei Verwendung dieser Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration ergeben sich auch für die berechneten Chl/Protein-Verhältnisse die plausibleren Werte. Allerdings ergeben sich mit den Literaturwerten übereinstimmende Chl/Protein-Verhältnisse von ca. 0,5 auch mit dieser Methode nur für diejenigen Chl-WSCP-Komplexe, die ein Chl-*a/b*-Verhältnis von 3 oder höher aufweisen. Bei Chl-*b*-WSCP bzw. bei Komplexen, die einen hohen Chl-*b*-Anteil haben, lagen alle errechneten Chl/Protein-Verhältnisse über 0,6. Es bedarf noch weiterer Analysen, um festzustellen, ob diese Werte den tatsächlichen Pigmentbindungszuständen entsprechen.

4.1.5 Bindungsaffinität für Chl *a* und Chl *b*

Natives Blumenkohl-WSCP gehört zu den Klasse-IIA-WSCPs, die ein Chl-*a/b*-Verhältnis von 6-10 aufweisen (Satoh *et al.*, 2001). Um zu erforschen, ob dieser hohe Chl-*a*-Anteil auf einer höheren Bindungsaffinität gegenüber Chl *a* beruht wurde das rekombinante Protein mit unterschiedlichen Chl-*a/b*-Angeboten rekonstituiert und anschließend das jeweilige Chl-*a/b*-Verhältnis der gebundenen Pigmente bestimmt. Bei der Rekonstitution wurde sichergestellt, dass die angebotenen Pigmente vollständig gelöst vorlagen und somit dem Protein zur

Verfügung standen. Somit entspricht das in Abb. 4-6 angegebene angebotene Chl-*a/b*-Verhältnis dem tatsächlichen Chl-*a/b*-Angebot.



In Abb. 4-6 kann man einen nahezu linearen Zusammenhang zwischen dem Chl-*a/b*-Angebot und dem Chl-*a/b*-Verhältnis der gebundenen Pigmente sehen. Das Chl-*a/b*-Verhältnis der vom Protein gebundenen Pigmente entspricht in etwa dem angebotenen Verhältnis – es ist somit unter diesen Rekonstitutionsbedingungen keine höhere Bindungsaffinität für Chl *a* zu erkennen.

Rekonstituiert man das Protein allerdings in Lösung und somit nicht an einer Ni-Säule immobilisiert, scheint es doch eine höhere Affinität für Chl *a* aufzuweisen. Bei einem Chl-*a/b*-Angebot von ca. 3 (Totalextrakt) werden bei dieser Art von Rekonstitution die Pigmente in einem Verhältnis von ca. 8 (+/- 1) gebunden, was mit dem Chl-*a/b*-Verhältnis im nativen BoWSCP vergleichbar ist (s. 1.2.2 sowie 4.1.2.2). Ein Unterschied zwischen den beiden Rekonstitutionsmethoden bezüglich des Chl-*a/b*-Verhältnisses der gebundenen Pigmente bei gleichem Angebot wurde auch unter Anleitung der Autorin im Rahmen der Diplomarbeit von Kristina Gundlach (2006) festgestellt.

Trotz der Hinweise, dass WSCP möglicherweise doch eine höhere Bindungsaffinität für Chl *a* besitzt, gibt es keine Hinweise, dass einmal gebundenes Chl *b* vom Komplex dissoziiert. Sowohl in der Gelelektrophorese (s. 4.1.8) als auch bei Hitzebehandlung (s. 4.1.7.1) zeigt sich kein Verlust von gebundenem Chl *b* im Vergleich zu Chl *a*, so dass auch Chl *b* relativ stabil gebunden ist.

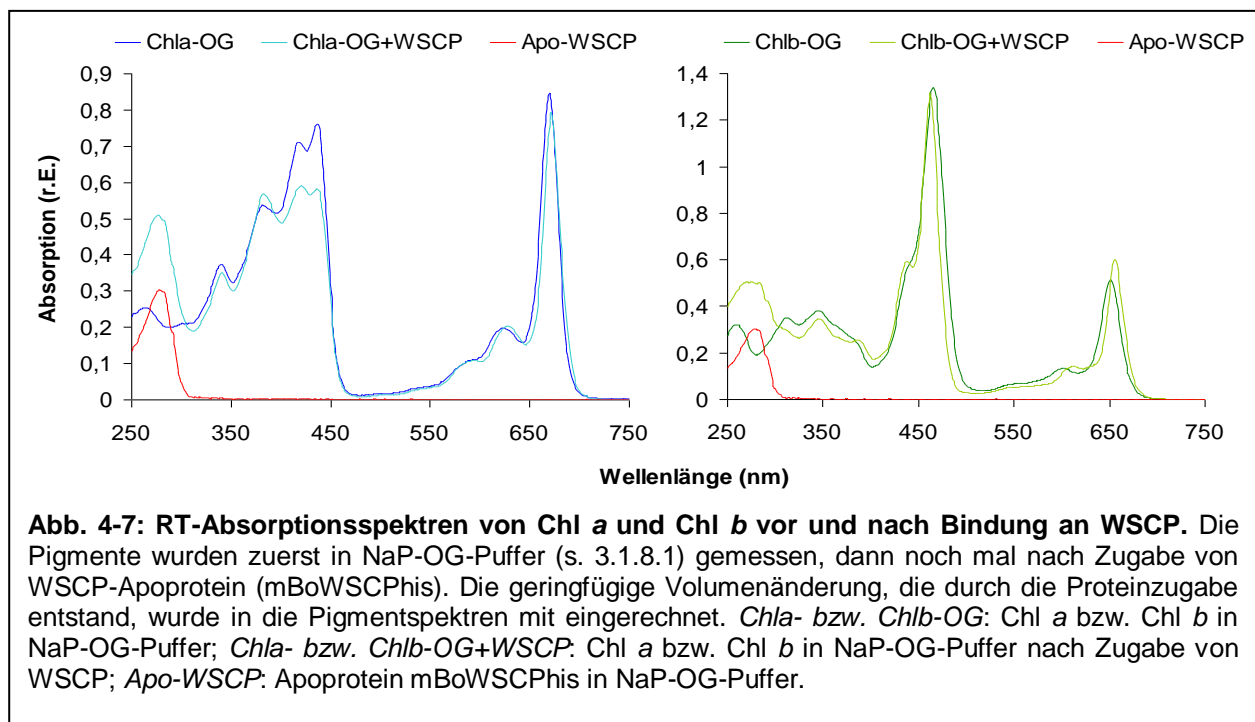
4.1.6 Spektroskopische Eigenschaften der gebundenen Chlorophylle

Mit seinem einfachen Aufbau (Homotetramer, mit je einer Chl-Bindungsstelle pro Monomer) stellt WSCP ein ideales System für die Erforschung von Chl-Protein-Interaktionen und des Energietransfers zwischen proteingebundenen Chlorophyllen dar. Daher wurden die

spektroskopischen Eigenschaften der WSCP-gebundenen Chlorophylle eingehend untersucht und sind in den folgenden Teilabschnitten beschrieben.

4.1.6.1 Einfluss der WSCP-Bindung auf die Chl-Absorptionseigenschaften

Die spektroskopischen Eigenschaften von Chlorophyllen werden stark durch das sie umgebende Lösungsmittel beeinflusst (Seely und Jensen, 1965). Hier wurde untersucht, in wiefern sich die Grundzustands-RT-Absorptionsspektren von Chl *a* und Chl *b* durch die Bindung an WSCP ändern. Dazu wurden die Pigmente zuerst in Puffer mit 1% OG gemessen. Das Detergens war nötig, um die Pigmente in Lösung zu halten. Gemessen wurde demnach das Spektrum des jeweiligen Pigments in Detergensmicellen. Anschließend wurde jeweils eine äquimolare Menge WSCP (mBoWSCPHis-Apoprotein) in konzentrierter Form zugegeben, um das Volumen nicht maßgeblich zu verändern, und das Spektrum erneut gemessen. Um sicher zu gehen, dass bei dieser Messung die Pigmentbindung durch das Protein bereits abgeschlossen war, wurde 30 Minuten nach Proteinzugabe nochmals gemessen – das zweite Spektrum war mit dem ersten identisch (hier nicht abgebildet).



In Abb. 4-7 sieht man, dass sich das Absorptionsspektrum beider Pigmente bei Bindung an WSCP deutlich verändert. Sowohl bei Chl *a* als auch bei Chl *b* verschiebt sich das Rotmaximum in den längerwelligen Bereich – bei Chl *a* um 2 nm, bei Chl *b* sind es sogar 5 nm (s. auch Tab. 4-3). Vor allem bei Chl *b* ist zu beobachten, dass sich der Peak des Rotmaximums nach Bindung an das Protein verschmälert und – im Gegensatz zu Chl *a* – erhöht sich dabei gleichzeitig seine Amplitude. Bei Chl *a* findet durch die Proteinbindung ebenfalls eine leichte Verschmälерung des Peaks statt, gleichzeitig jedoch eine geringe Erniedrigung der Amplitude des Rotmaximums. Berechnet man die jeweilige Fläche im Wellenlängenbereich von 550-750 nm (q_x/q_y -Region), so stellt man für Chl in OG-Micellen fest, dass nach der Proteinbindung die Gesamtabsorption im q_x/q_y -Bereich von Chl *a* sich um

ca. 6,8% verringert, während die von Chl *b* sich nur unwesentlich um knapp 0,4% erhöht und somit praktisch unverändert bleibt.

Neben der durch das Protein bedingten erhöhten Absorption im UV-Bereich ist die auffälligste Veränderung im Spektrum, die nach Proteinbindung auftritt, bei der Chl-*a*-Probe zu sehen: die beiden Peaks zwischen 410 und 440 nm zeigen deutlich niedrigere Amplituden als beim freien Chl *a*, und zwar um 17,1% bzw. 23,6% verringert (s. Tab. 4-3). Bei der Chl-*b*-Probe fällt zudem auf, dass nach Bindung an WSCP zwei zusätzliche Maxima entstehen (bei 387 und 438 nm, vgl. Tab. 4-3), die vorher nur als leichte Schulter zu sehen waren.

Der Einfluss der Proteinbindung auf die Absorptionsmaxima der Chlorophylle im sichtbaren Bereich ist in unten aufgeführter Tabelle zusammengefasst:

Tab. 4-3: Absorptionsmaxima von Chl *a* und Chl *b* vor und nach WSCP-Bindung. Aufgeführt sind nur die Maxima im Spektralbereich 340-750 nm. Wenn nicht anders vermerkt sind die Werte in nm angegeben. *Chla-* bzw. *Chlb*-OG: Chl *a* bzw. Chl *b* in NaP-OG-Puffer; *Chla-* bzw. *Chlb*-OG+WSCP: Chl *a* bzw. Chl *b* in NaP-OG-Puffer nach Zugabe von WSCP; *k.A.*: keine Angabe möglich.

Chla-OG	Chla-OG+WSCP	Amplitude nach WSCP-Bindung	Chlb-OG	Chlb-OG+WSCP	Amplitude nach WSCP-Bindung
340	340	- 6,4%	346	346	- 9,4%
382	383	+ 5,8%		387	<i>k.A.</i>
418	420	- 17,1%		438	<i>k.A.</i>
437	436	- 23,6%	465	462	- 1,9%
624	628	+ 3,0%	602	613	+ 6,0%
670	672	- 6,4%	651	656	+ 16,9%

In Abb. 4-7 ist zusätzlich zu den Chl-Absorptionsspektren noch das Spektrum des WSCP-Apoproteins dargestellt. Die Probe wurde in der Konzentration gemessen, in der sie auch bei den entsprechenden Chl-WSCP-Proben vorlag, um die Spektren direkt vergleichen zu können. Für die Bestimmung des Chl/Protein-Verhältnisses (s. 4.1.4) über den A_{280} -Wert aus den Absorptionsspektren der Chl-WSCP-Komplexe war es wichtig zu wissen, in wieweit die Bindung an das Protein die Chl-Absorptionseigenschaften bei 280 nm beeinflusst.

Die in Abb. 4-7 abgebildeten Spektren geben Aufschluss darüber. Addiert man den A_{280} -Wert des Apoproteins zu den jeweiligen A_{280} -Werten des freien Chl *a* bzw. Chl *b*, so erhält man bei Chl *a* für diesen theoretischen Chl-*a*-WSCP-Komplex eine Absorption bei 280 nm von 0,509, bei Chl-*b*-WSCP einen Wert von 0,491. Diese beiden Werte stimmen gut überein mit den tatsächlichen A_{280} -Werten der Chl-WSCP-Komplexe – bei Chl-*a*-WSCP (Abb. 4-7, links) liegt

er bei 0,5, bei Chl-*b*-WSCP (Abb. 4-7, rechts) bei 0,495. Das deutet darauf hin, dass die Proteinumgebung wenig oder keine Veränderung der Chl-Absorption bei 280 nm bewirkt. Für Chl-*a*-WSCP ergibt sich dadurch, dass Chl *a* einen Anteil von ca. 41% an der Gesamtabsorption bei 280 nm beiträgt; für Chl-*b*-WSCP ergibt sich entsprechend ein Chl-*b*-Anteil von ca. 39% am A_{280} -Wert des Pigment-Protein-Komplexes. Allerdings kann man an diesen Spektren nicht erkennen, ob sich das Chl-Spektrum im UV-Bereich durch die Proteinbindung verschiebt, beispielsweise um einige nm in den längerwelligen Bereich, wie es beim Rotabsorptionsmaximum der Fall ist. Wäre dies der Fall, würde sich das jedoch nur geringfügig auf den prozentualen Anteil des Pigments an dem A_{280} -Wert auswirken (\pm 3%, bei einer angenommenen maximalen Verschiebung um 5 nm). Somit sollte die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Bestimmung des Chl/Protein-Verhältnisses, bei der der A_{280} -Wert von reinem Chl vom A_{280} -Wert des Chl-WSCP-Komplexes subtrahiert wird, um die Proteinkonzentration zu ermitteln (vgl. 4.1.4), genau genug sein – vorausgesetzt, man normiert (vor allem bei Chl-*b*-WSCP) das Chl-Spektrum auf die Gesamtabsorption im q_x/q_y -Bereich des Chl-WSCP-Komplexes (nähere Erläuterung s. 4.1.4).

4.1.6.2 Absorptions- und CD-Spektren in Abhängigkeit von Chl *a/b*

WSCP bindet sowohl Chl *a* als auch Chl *b*. Bei Rekonstitutionen mit Gesamtpigmentextrakt (Totalextrakt, TE) aus Erbsen, der ein Chl-*a/b*-Verhältnis von ca. 3 besitzt, entstehen dadurch heterogene WSCP-Komplexe, bei denen einige nur Chl *a* enthalten, einige beide Chlorophylle enthalten und möglicherweise auch einige, die nur Chl *b* enthalten (s. hierzu auch 4.1.6.3.2). Das Chl-*a/b*-Verhältnis der rekonstituierten Komplexe entspricht dabei dem tatsächlich angebotenen Verhältnis (vgl. 4.1.5) und variiert somit je nach Löslichkeit der Chlorophylle in den einzelnen Rekonstitutionsansätzen (v.a. Chl *a* tendiert dazu, zu aggregieren und somit nicht mehr für das Protein zu Verfügung zu stehen).

Wie bereits erwähnt war es zu Anfang dieser Arbeit wichtig festzustellen, ob das rekombinante WSCP dem nativen Protein ähnlich genug ist, um als Ersatz hierfür bei den meisten Versuchen dienen zu können. Da sich bei den Absorptions- und CD-Spektren Unterschiede zwischen den beiden Pigment-Protein-Komplexen zeigten (s. 4.1.2.2), diese aber auch unterschiedliche Chl-*a/b*-Verhältnisse aufwiesen (nativ: \sim 8, rekombinant: \sim 3), musste die Frage geklärt werden, ob diese Unterschiede nur aufgrund der unterschiedlichen Chl-*a/b*-Verhältnisse zustande kamen, oder ob sich die Komplexe grundlegend unterscheiden. Hierzu wurde rekombinantes BoWSCP mit unterschiedlichen Chl-*a/b*-Angeboten rekonstituiert und jeweils ein Absorptions- und ein CD-Spektrum der resultierenden Pigment-Protein-Komplexe gemessen.

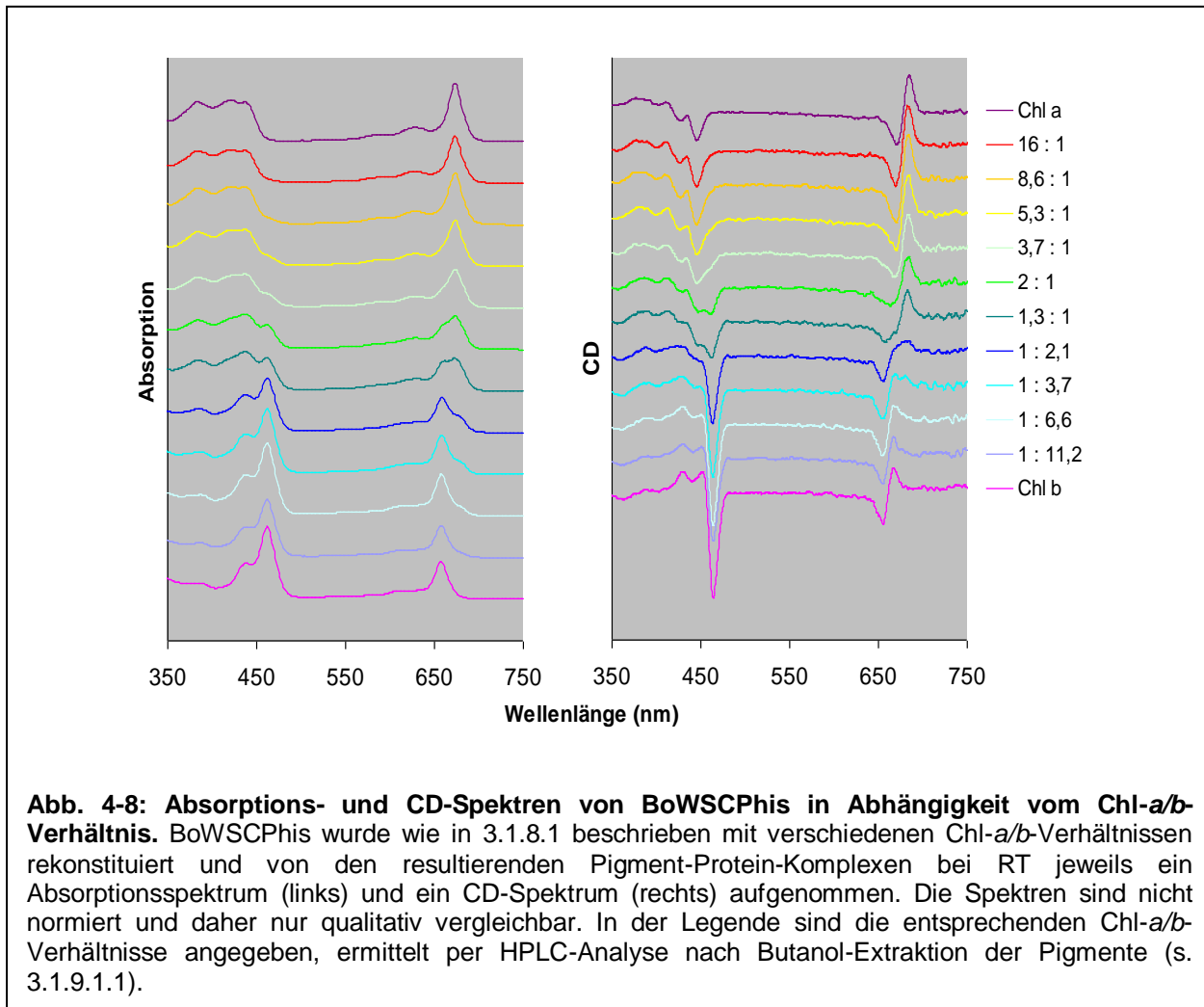


Abb. 4-8: Absorptions- und CD-Spektren von BoWSCPhis in Abhängigkeit vom Chl-*a/b*-Verhältnis. BoWSCPhis wurde wie in 3.1.8.1 beschrieben mit verschiedenen Chl-*a/b*-Verhältnissen rekonstituiert und von den resultierenden Pigment-Protein-Komplexen bei RT jeweils ein Absorptionsspektrum (links) und ein CD-Spektrum (rechts) aufgenommen. Die Spektren sind nicht normiert und daher nur qualitativ vergleichbar. In der Legende sind die entsprechenden Chl-*a/b*-Verhältnisse angegeben, ermittelt per HPLC-Analyse nach Butanol-Extraktion der Pigmente (s. 3.1.9.1.1).

In Abb. 4-8 kann man deutlich sehen, wie sich die Absorptions- und CD-Spektren von Chl-WSCP in Abhängigkeit vom Chl-*a/b*-Verhältnis verändern. Betrachtet man die Absorptionsspektren (links), so kann man erkennen, dass sich bei absteigendem Chl-*a/b*-Verhältnis das Rotmaximum von 673 nm in den kürzerwelligen Bereich nach 657 nm verschiebt. Auch im blauen Wellenlängenbereich können einige Veränderungen beobachtet werden: ab einem Chl-*a/b*-Verhältnis von ca. 9 und niedriger taucht eine Schulter bei 462 nm auf, die sich ab einem Chl-*a/b*-Verhältnis von ca. 0,5 als Chl-*b*-Blaumaximum herausstellt. Gleichzeitig verschwinden die Chl-*a*-Peaks bei 383 und 420 nm. Dies war zu erwarten, da es sich dabei um die allmähliche Umwandlung des Absorptionsspektrums von Chl-*a*-WSCP in das von Chl-*b*-WSCP handelt – diese beiden Spektren wurden bereits in Abschnitt 4.1.6.1 beschrieben.

Auch bei den CD-Spektren (Abb. 4-8, rechts) kann man erkennen, dass sich das Chl-*a/b*-Verhältnis der Probe auf das CD-Signal auswirkt. Je höher der Chl-*b*-Anteil, desto stärker ist das Spektrum nach „innen“ verschoben. Im blauen Spektralbereich verschiebt sich das Hauptminimum von 445 nm (Chl-*a*-WSCP) nach 464 nm (Chl-*b*-WSCP) und nimmt deutlich an Amplitude zu. Das Minimum im roten Spektralbereich wandert dabei von 670 nm nach 655 nm, das Rotmaximum von 685 nm nach 667 nm.

Bezieht man diese Beobachtungen nun auf den Vergleich zwischen nativem und rekombinantem BoWSCP, so können die Unterschiede in den Absorptions- und CD-Spektren zwischen den beiden Proteinen durch die unterschiedlichen Chl-*a/b*-Verhältnisse erklärt werden.

4.1.6.3 Energieübertragung zwischen den gebundenen Chlorophyllen

Die CD-Spektren von nativem und rekombinantem BoWSCP zeigen in der q_y -Region ein negatives und ein positives CD-Signal mit annähernd gleicher Amplitude und Fläche (s. 4.1.2.2 und 4.1.6.2). Diese hohe Symmetrie im q_y -Bereich deutet auf eine starke excitonische Kopplung der Chlorophylle hin (Theiss *et al.*, 2007). Um den Anregungsenergieübertrag der Chlorophylle näher zu untersuchen, wurden im Rahmen einer Forschungskoooperation mit der TU Berlin zeitaufgelöste Absorptions- und Fluoreszenzspektren an rekombinantem Chl-BoWSCP gemessen.

4.1.6.3.1 Zeitaufgelöste Absorptionsspektren

In Abb. 4-9 sieht man transiente Absorptionsspektren, die an Chl-BoWSCP-Komplexen mit einem Chl-*a/b*-Verhältnis von 2,6:1 gemessen wurden. Die Auflösung liegt dabei im Femtosekundenbereich. Die Messungen wurden im Rahmen der Dissertation von Christoph Theiss am Institut für Optik und Atomare Physik (IOAP) der TU Berlin durchgeführt. Dabei wurden die Chlorophylle mit Laserpulsen bei 460 nm in die Soret-Bande von Chl *b* angeregt, und die Ausbleichungen innerhalb des q_y -Bereichs zu verschiedenen Verzögerungszeiten zwischen dem Anregungs- und dem Messpuls gemessen. Die Ausbleichung ist jeweils dargestellt als Differenzspektrum zwischen dem Grundzustandsabsorptionsspektrum des Pigment-Protein-Komplexes und seinem Absorptionsspektrum nach dem Anregungspuls.

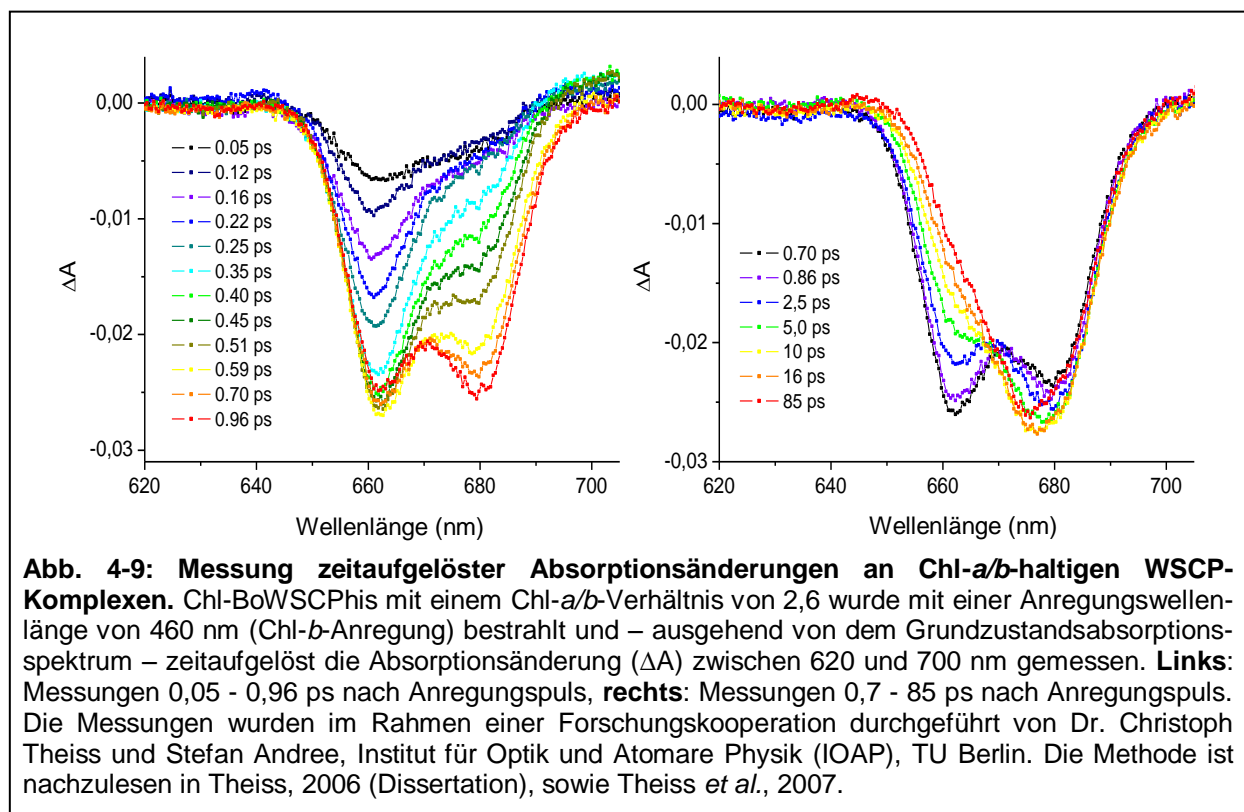


Abb. 4-9: Messung zeitaufgelöster Absorptionsänderungen an Chl-*a/b*-haltigen WSCP-Komplexen. Chl-BoWSCP mit einem Chl-*a/b*-Verhältnis von 2,6 wurde mit einer Anregungswellenlänge von 460 nm (Chl-*b*-Anregung) bestrahlt und – ausgehend von dem Grundzustandsabsorptionsspektrum – zeitaufgelöst die Absorptionsänderung (ΔA) zwischen 620 und 700 nm gemessen. **Links:** Messungen 0,05 - 0,96 ps nach Anregungspuls, **rechts:** Messungen 0,7 - 85 ps nach Anregungspuls. Die Messungen wurden im Rahmen einer Forschungskoooperation durchgeführt von Dr. Christoph Theiss und Stefan Andree, Institut für Optik und Atomare Physik (IOAP), TU Berlin. Die Methode ist nachzulesen in Theiss, 2006 (Dissertation), sowie Theiss *et al.*, 2007.

Durch die Anregung in die Soret-Bande von Chl *b* wurde sichergestellt, dass möglichst wenig direkte Anregung von Chl *a* erfolgt und somit eine Ausbleichung von Chl *a* durch den Anregungsenergieübertrag von Chl *b* auf Chl *a* bedingt ist. Die selektive Anregung von Chl *b* führt als erstes zu einer Ausbleichung der Chl-*b*-Absorptionsbande bei 661 nm, dabei wird das Maximum der Ausbleichung innerhalb der ersten 600 fs erreicht (Abb. 4-9, links und Abb. 4-10). Etwas zeitverzögert setzt auch die Ausbleichung der Chl-*a*-Absorptionsbande bei 681 nm ein, welche nach etwa 2,5 ps ihr Maximum erreicht und schließlich in eine Ausbleichung der Chl-*a*-Absorptionsbande bei 675 nm übergeht (Abb. 4-9, rechts). Nach 85 ps sieht man keine Chl-*b*-Ausbleichung mehr und es ist hauptsächlich die Chl-*a*-Ausbleichung bei 675 nm vorhanden.

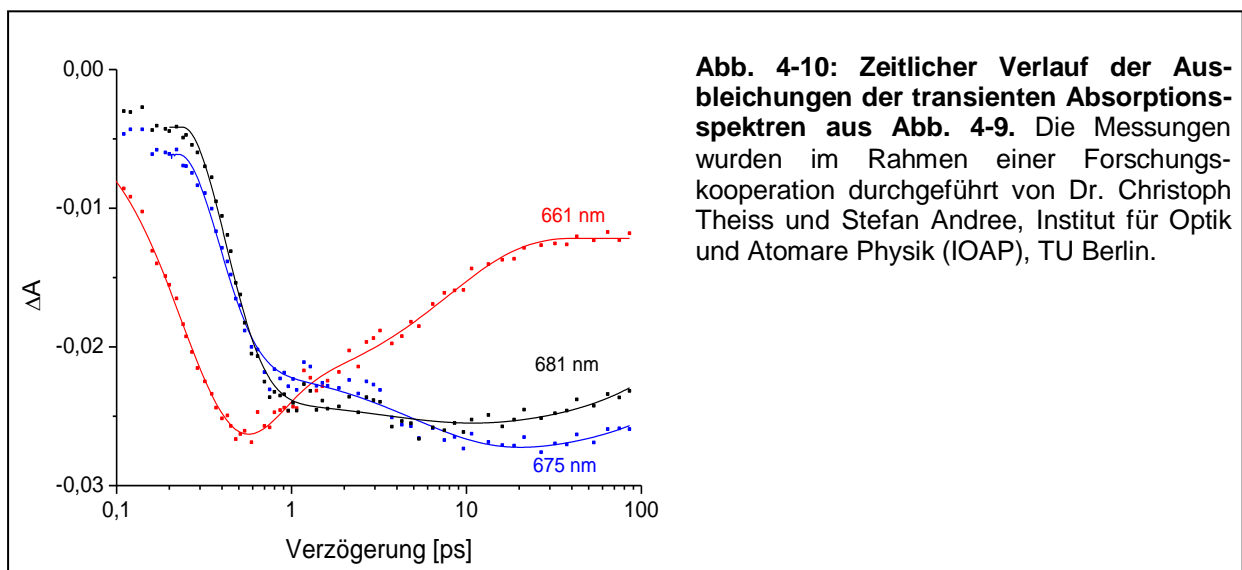


Abb. 4-10: Zeitlicher Verlauf der Ausbleichungen der transienten Absorptionsspektren aus Abb. 4-9. Die Messungen wurden im Rahmen einer Forschungs-kooperation durchgeführt von Dr. Christoph Theiss und Stefan Andree, Institut für Optik und Atomare Physik (IOAP), TU Berlin.

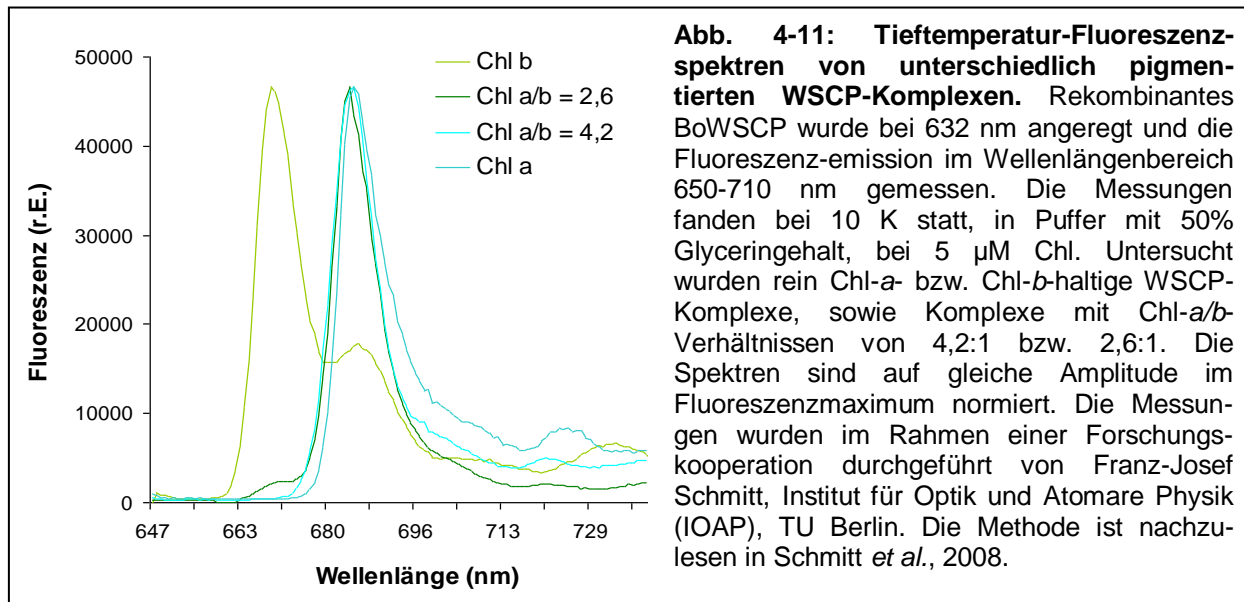
Betrachtet man die Kinetik der transienten Absorptionsänderungen der einzelnen Absorptionsbanden (Abb. 4-10), fällt auf, dass die Chl-*a*-Ausbleichung zum Ende der 85 ps Messzeit kaum abgeklungen ist (schwarze und blaue Kurve). Von den beiden Chl-*a*-Banden bleicht die Bande bei 675 nm stärker aus und erreicht das Maximum der Ausbleichung etwas später als die Bande bei 681 nm.

Eine genauere Analyse der Kinetiken (durchgeführt von Dr. Christoph Theiss) hat ergeben, dass die Relaxation der Chl-*b*-Ausbleichung bei 661 nm (rote Kurve) in zwei zeitliche Komponenten aufgeteilt werden kann – eine schnelle Komponente von ca. 0,4 ps zu Beginn der Relaxation, und im Anschluss eine langsame zeitliche Komponente von ca. 7-8 ps. Diese Abklingzeiten der Chl-*b*-Anregung korrelieren mit der Kinetik der Chl-*a*-Ausbleichung (schwarze und blaue Kurve), was ein deutlicher Hinweis auf einen Anregungsenergieübertrag von Chl *b* auf Chl *a* ist.

Entsprechende Messungen wurden auch an WSCP-Komplexen mit einem Chl-*a/b*-Verhältnis von 4,2:1 durchgeführt, sowie an rein Chl-*a*- bzw. Chl-*b*-haltigen WSCP-Komplexen (Daten nicht gezeigt). Bei allen Messungen zeigte sich ein Anregungsenergieübertrag zwischen den an das Protein gebundenen Chlorophyllen.

4.1.6.3.2 Tieftemperatur-Fluoreszenzspektren

Bei tiefen Temperaturen ist die spektrale Auflösung gegenüber Raumtemperaturmessungen verbessert, da die Molekülschwingungen vermindert sind und somit eine Bandenschärfung auftritt. In Abb. 4-11 sind Tieftemperatur-Fluoreszenzspektren von verschiedenen pigmentierten WSCP-Komplexen dargestellt. Die Messungen erfolgten bei 10 K und wurden durchgeführt von Franz-Josef Schmitt am Institut für Optik und Atomare Physik (IOAP) der TU Berlin.



Die Pigment-Protein-Komplexe wurden bei 632 nm angeregt, d.h. es wurde vorwiegend Chl *b* angeregt. Man sieht, dass sich das Emissionsspektrum von Chl-*b*-WSCP deutlich von den anderen Spektren unterscheidet – das Emissionsmaximum liegt bei ca. 668 nm, während es bei den Chl-*a/b*- und Chl-*a*-Komplexen zwischen 683 und 685 nm liegt. Vergleicht man die Spektren der beiden WSCP-Komplexe, die Chl *a* und Chl *b* in einem Verhältnis von 4,2 bzw. 2,6 gebunden haben, sieht man nur bei den Komplexen mit Chl *a/b* = 2,6 eine kleine Schulter von Chl-*b*-Fluoreszenz bei ungefähr 670 nm. Bei den Komplexen mit Chl *a/b* = 4,2 ist kein signifikantes Fluoreszenzsignal bei 670 nm detektierbar.

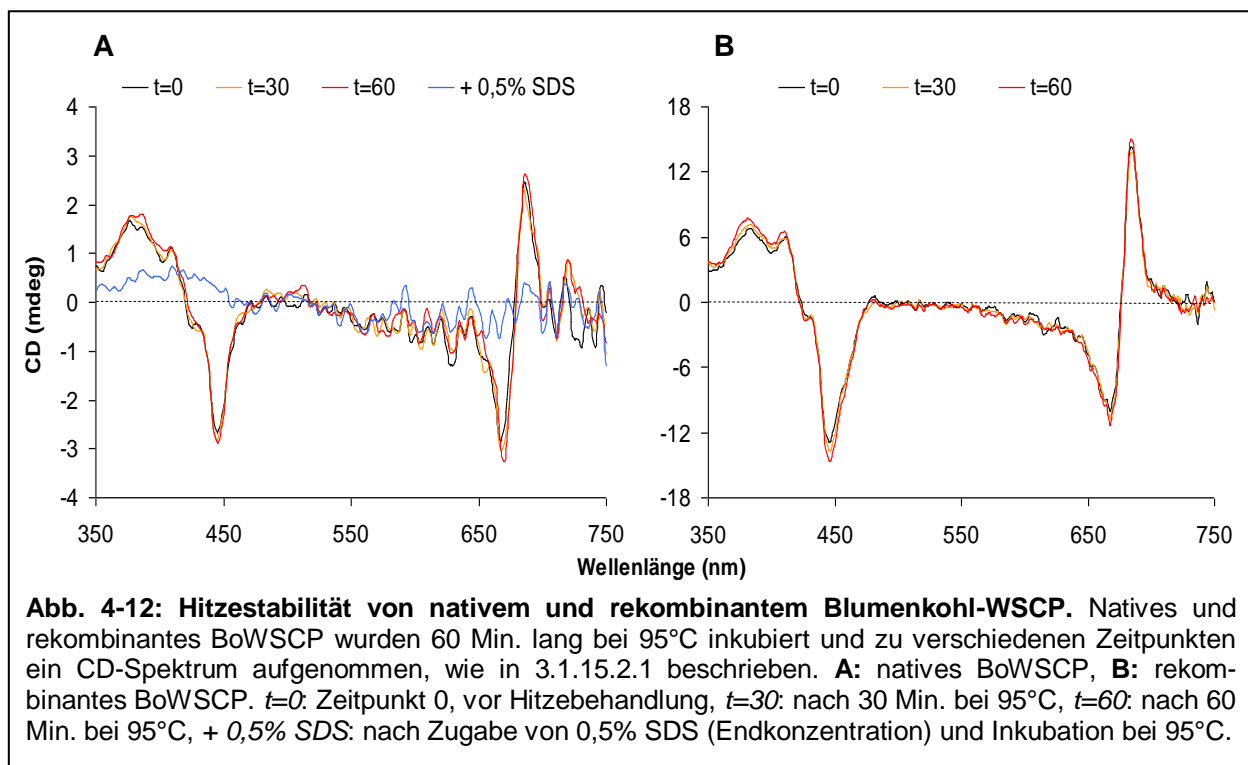
Die Tatsache, dass selbst bei den WSCP-Komplexen mit einem niedrigen Chl-*a/b*-Verhältnis von 2,6 fast ausschließlich Chl-*a*-Fluoreszenz nach Chl-*b*-Anregung beobachtet wird, ist wieder ein deutliches Indiz für Anregungsenergietransfer von Chl *b* auf Chl *a*. Gleichzeitig bedeutet dies, dass bei den gemischten Chl-*a/b*-WSCP-Komplexen fast keine Chl-*b*-Homodimere vorkommen. Eine nähere Analyse der Fluoreszenzspektren (durchgeführt von Franz-Josef Schmitt) ergab, dass der Anteil an ungekoppelten Chl-*b*-Molekülen oder an Chl-*b*-Homodimeren unter 5% liegt bei den WSCP-Komplexen mit Chl *a/b* = 2,6. Bei den Komplexen mit dem höheren Chl-*a/b*-Verhältnis von 4,2 liegt der Anteil sogar unter 2%.

4.1.7 Untersuchungen zur Stabilität von WSCP

4.1.7.1 Hitzestabilität

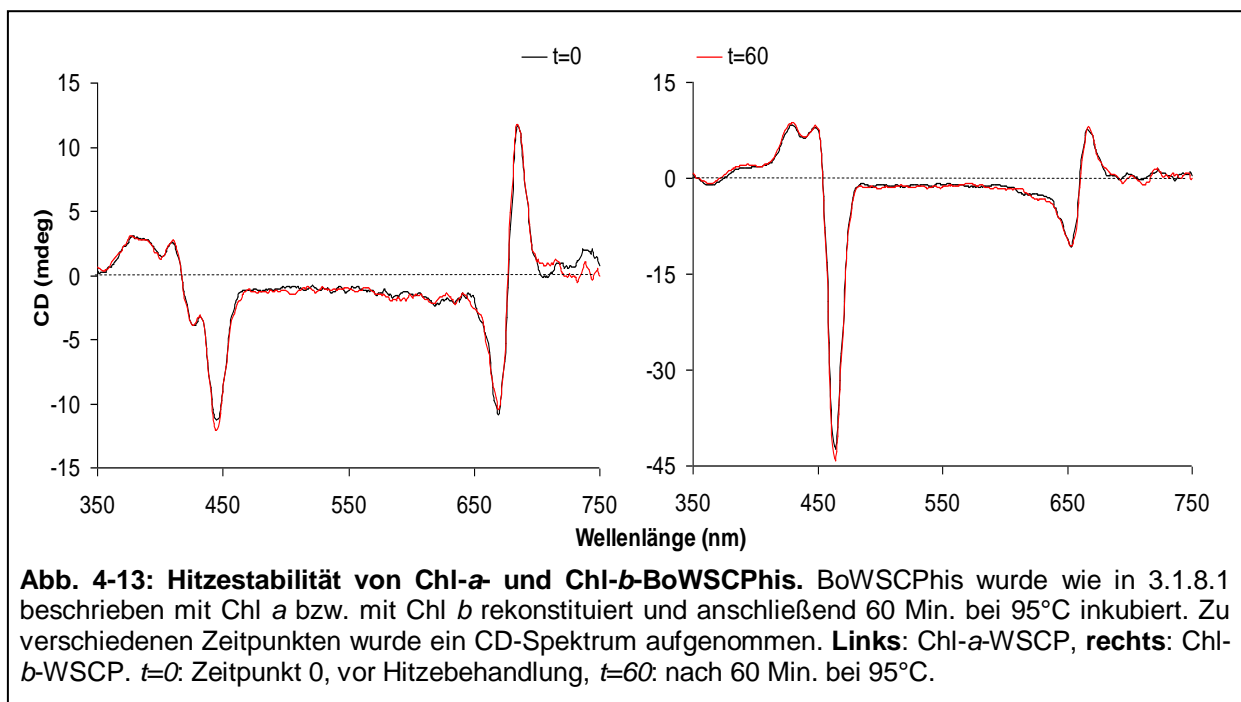
In der Literatur ist bereits von einigen nativen WSCP-Komplexen aus verschiedenen Pflanzen beschrieben, dass sie hitzestabil sind (Oku *et al.*, 1972; Kamimura *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 2003). Es handelte sich jedoch höchstens um eine Hitzebehandlung von 10 Minuten Dauer. In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob die nativen Pigment-Protein-Komplexe auch einer längeren Hitzebehandlung bei 95 bzw. 100°C standhalten und dabei auch ein Vergleich mit den rekombinanten Komplexen durchgeführt. Dies war eine weitere Möglichkeit, um zu überprüfen, ob die Eigenschaften des rekombinanten Proteins mit denen des nativen Proteins vergleichbar sind.

Die Komplexe wurden eine Stunde lang bei 95°C inkubiert und die Proteinfaltung sowie die Pigmentbindung mittels CD-Spektroskopie überwacht.



In Abb. 4-12 kann man den Vergleich zwischen nativem (A) und rekombinantem (B) WSCP sehen und stellt fest, dass sie beide eine vergleichbar hohe Thermostabilität aufweisen. Selbst nach einer Stunde bei 95°C weisen weder die CD-Spektren des nativen Proteins noch die des rekombinanten Proteins signifikante Unterschiede zu den Spektren vor der Hitzebehandlung auf. Um zu zeigen, dass eine mögliche Denaturierung der pigmentierten Komplexe während der Hitzebehandlung mittels CD-Spektroskopie zu verfolgen wäre, wurde das native Protein im Anschluss an den Versuch mit SDS versetzt und erneut auf 95°C erhitzt, um die Komplexe absichtlich zu denaturieren, und dabei ein CD-Spektrum gemessen. In Abb. 4-12 A ist deutlich zu erkennen, dass dabei die für den Pigment-Protein-Komplex typischen CD-Signale verschwinden und nur noch die schwachen intrinsischen CD-Signale der Pigmente zu sehen sind.

Neben nativem und rekombinantem WSCP sollten auch WSCP-Komplexe, die nur Chl *a* bzw. Chl *b* enthalten, bezüglich ihrer Thermostabilität miteinander verglichen werden. Dies könnte einen weiteren möglichen Hinweis darüber liefern, ob WSCP bevorzugt Chl *a* bindet, vorausgesetzt man geht davon aus, dass dies gleichzeitig eine schwächere Bindung von Chl *b* bedeuten würde. Dann würde sich das Chl *b* während einer Hitzebehandlung möglicherweise aus den Pigment-Protein-Komplexen lösen, was man in den CD-Spektren verfolgen könnte.

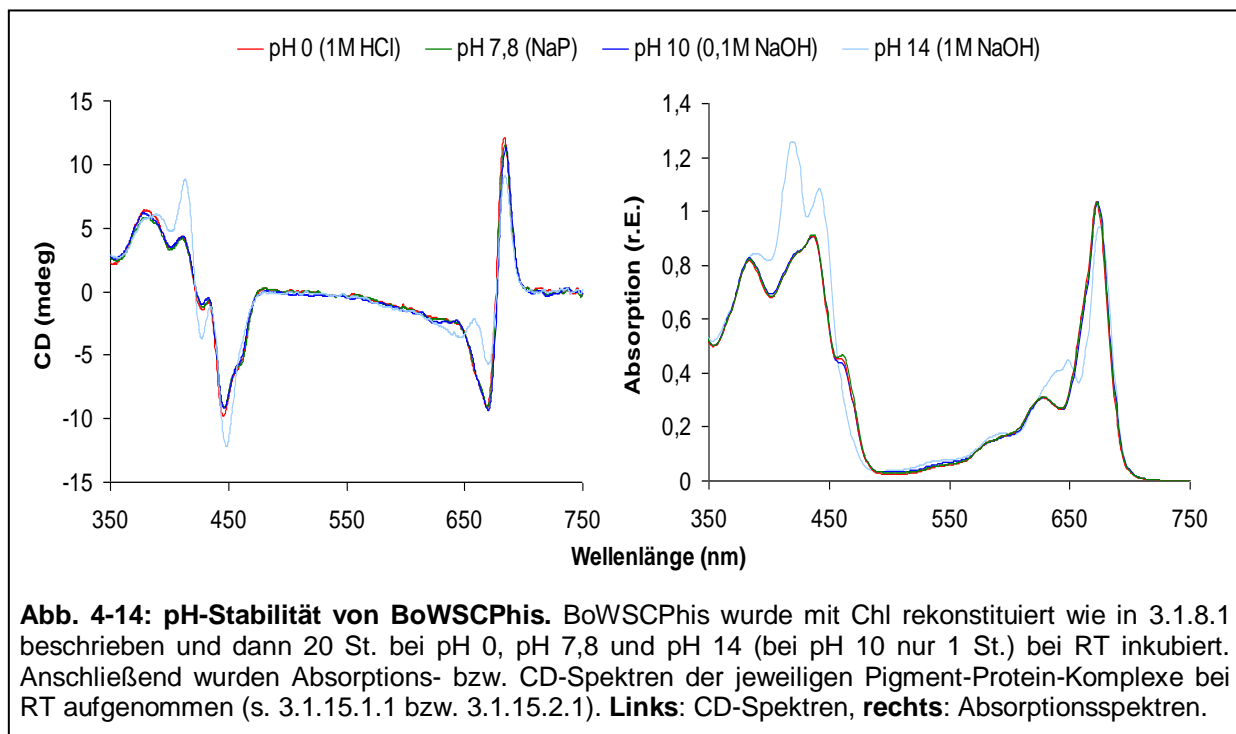


In Abb. 4-13 sieht man, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen kein Unterschied in der Thermostabilität von Chl-*a*-WSCP und Chl-*b*-WSCP festzustellen ist. Beide Arten des Pigment-Protein-Komplexes halten problemlos einer einstündigen Inkubation bei 95°C stand. Demnach scheint WSCP Chl *b* vergleichbar fest zu binden wie Chl *a*.

Chlid-WSCP ist im Gegensatz zu Chl-WSCP nicht hitzestabil und fängt bereits bei Temperaturen ab ca. 60°C an zu denaturieren (vgl. hierzu Diplomarbeit von Andrea Weil, 2007). Auch das unpigmentierte Apoprotein befindet sich nach dem Kochen der Probe und anschließender Zentrifugation vollständig im Pellet als denaturiertes Protein.

4.1.7.2 pH-Stabilität

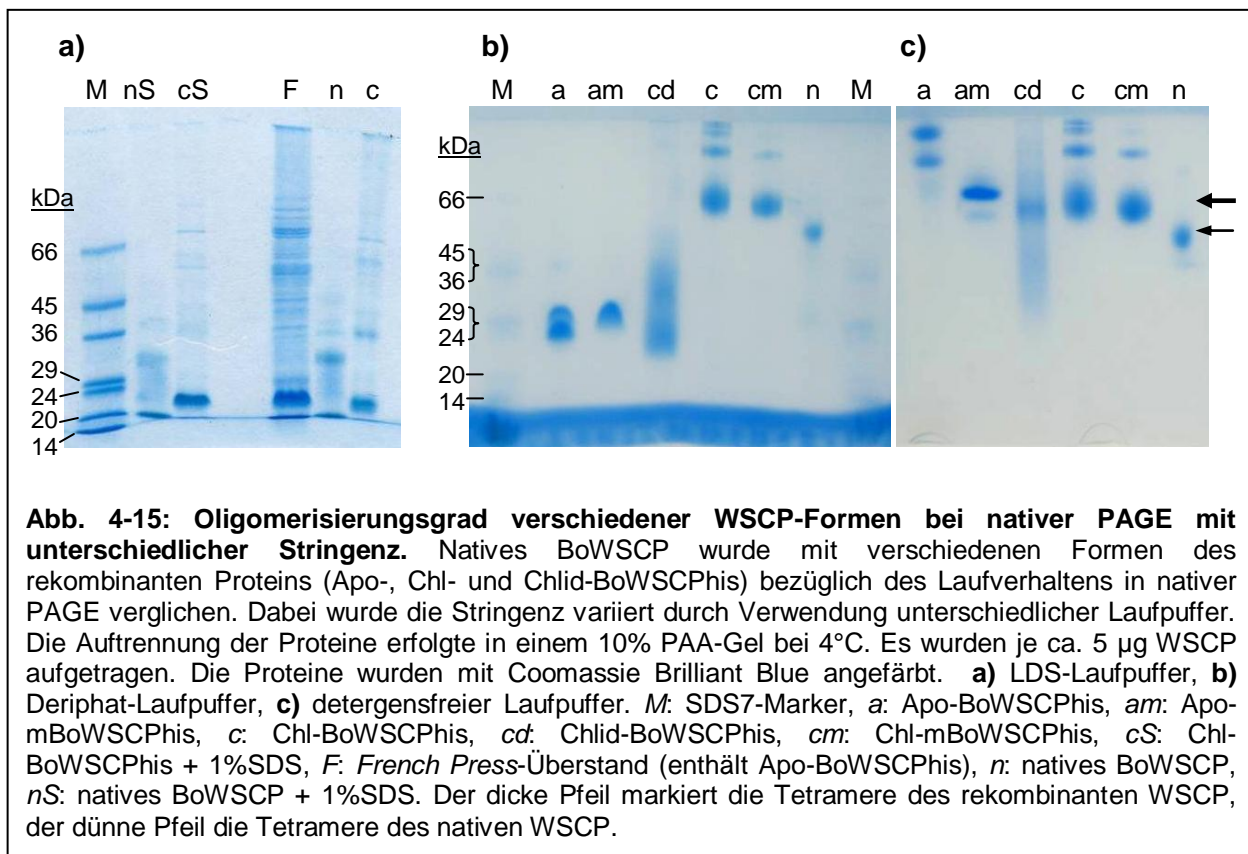
Die erstaunliche Hitzestabilität des Chl-WSCP-Komplexes (vgl. 4.1.7.1) warf die Fragestellung auf, ob die Komplexe auch eine ähnliche Stabilität gegenüber pH-Schwankungen besitzen. Die Frage ist auch interessant in Bezug auf die mögliche biologische Funktion des Proteins, da eine Begrenzung der Stabilität auf einen bestimmten pH-Bereich Hinweise auf den Aufenthaltsort des Proteins in der Zelle geben könnte und somit gleichzeitig auf die mögliche Funktion. Um die pH-Stabilität zu untersuchen, wurde mit Chl rekonstituiertes, rekombinantes Blumenkohl-WSCP bei den extrem-pH-Werten 0 (1 M HCl) und 14 (1 M NaOH) inkubiert, sowie bei pH 10 (0,1M NaOH) und zur Kontrolle in NaP bei pH 7,8.



Wie man in Abb. 4-14 sehen kann, ist WSCP erstaunlich pH-stabil. Selbst nach 20 Stunden Inkubation in 1 M HCl bzw. nach 1 Stunde in 0,1 M NaOH sind keine signifikanten Änderungen in den CD- oder Absorptionsspektren zu erkennen, die auf eine Denaturierung der Pigment-Protein-Komplexe bzw. auf eine Schädigung der Pigmente hinweisen könnten. Lediglich die Chl-*b*-Schulter bei 460 nm scheint leicht abzunehmen, bei pH 10 etwas mehr als bei pH 0. Auch die HPLC-Analyse der nach der Inkubation aus den Komplexen extrahierten Pigmente zeigte intakte Pigmente (Daten nicht gezeigt). An den CD-Spektren (Abb. 4-14, links) kann man durch die typische „Spiegelung“ des Spektrums im roten Wellenlängenbereich erkennen, dass die excitonische Kopplung der Pigmente und somit ihre gezielte Ausrichtung zueinander im Pigment-Protein-Komplex bestehen bleibt (Inkubation in 1 M HCl und 0,1 M NaOH). Bei der Probe, die 20 Stunden in 1 M NaOH bei RT inkubiert wurde sind jedoch starke Veränderungen der spektroskopischen Eigenschaften der Pigmente bzw. Pigment-Protein-Komplexe sichtbar, die eine Derivatisierung der Pigmente und somit eine vermutlich damit einhergehende Denaturierung der Komplexe anzeigen.

4.1.7.3 Oligomerisierungsgrad von Chl-, Chlid- und Apo-WSCP in nativer PAGE

In Schmidt *et al.* (2003) ist beschrieben, dass unpigmentiertes bzw. Chlid-haltiges WSCP eine monomere Form annimmt, im Gegensatz zu Chl-haltigem WSCP, welches als Tetramer vorkommt. Dies wurde so interpretiert, dass der Phytolschwanz der Chl-Moleküle essentiell für die Oligomerisierung von WSCP ist. Allerdings wiesen Versuche zur PAGE-Mobilität von WSCP, die unter Anleitung der Autorin im Rahmen der Diplomarbeit von Kristina Gundlach (2006) durchgeführt wurden darauf hin, dass unpigmentiertes WSCP doch eine höher oligomere Form annimmt, sofern man bei der nativen PAGE die Stringenz verringert. Um diesem Befund nachzugehen, wurde unpigmentiertes sowie mit Chlid und Chl pigmentiertes WSCP mittels nativer PAGE mit unterschiedlicher Stringenz aufgetrennt. Dabei wurde auch ein Vergleich zwischen dem WSCP-Volllängenklon BoWSCP_{His} und dem neuen verkürzten Klon mBoWSCP_{His} (s. hierzu 4.1.3) durchgeführt.



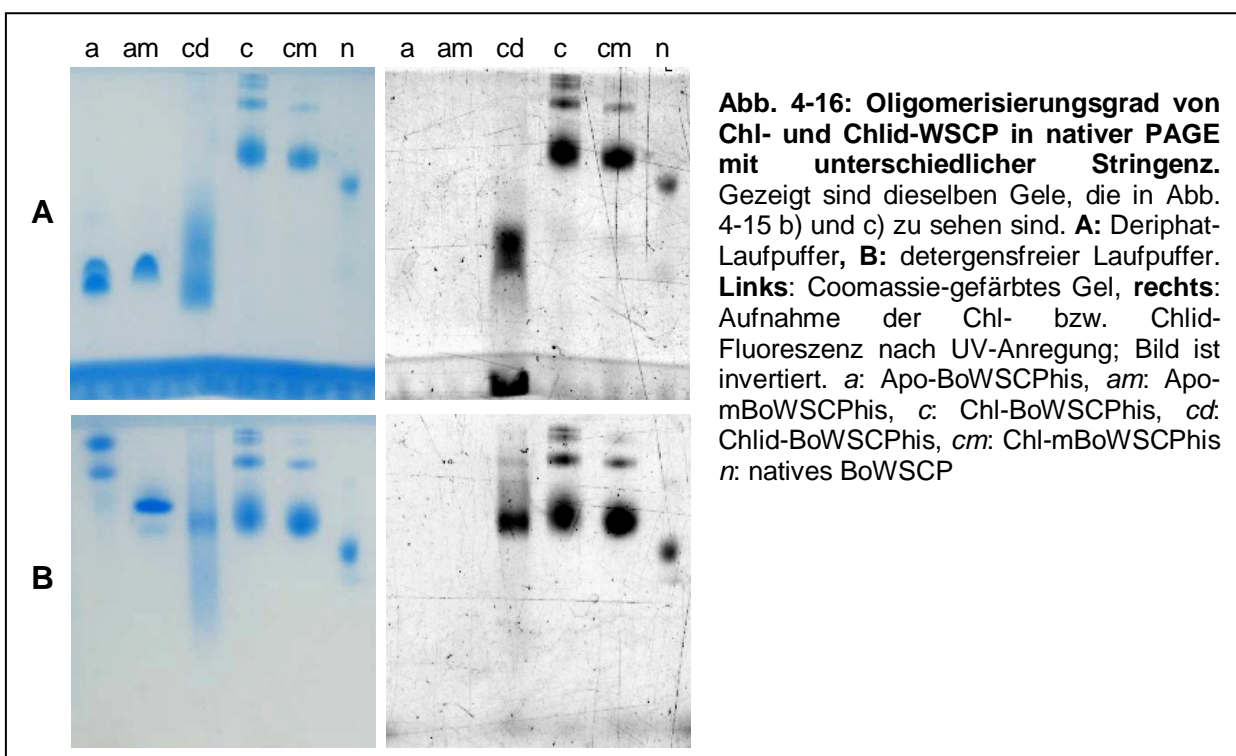
Es sind deutliche Unterschiede im Laufverhalten der unpigmentierten und der Chlid-haltigen Proben bei unterschiedlicher Stringenz zu sehen (Abb. 4-15). In Abb. 4-15 a) wurde bei der Gelelektrophorese LDS-Laufpuffer verwendet, was der höchsten Stringenz entspricht, bei b) wurde Deriphat-Puffer verwendet (mittlere Stringenz) und bei c) detergensfreier Puffer (niedrigste Stringenz). Man sieht deutlich, dass bei Verwendung von LDS-Laufpuffer alle Komplexe denaturieren und somit hauptsächlich die Monomer-Proteinbande zwischen 20 und 24 kDa im Gel auftritt.

Bei b) sind nicht alle Komplexe zu Monomeren zerfallen, sondern nur die unpigmentierten Proteine. Chl-WSCP hingegen erhält seine tetramere Form. Dieses Ergebnis stimmt mit den

Ergebnissen von Schmidt *et al.* (2003) überein. Lediglich Chlid-WSCP zeigt einen langgezogenen „Schmier“, der auf einen stetigen Zerfall von höheren Oligomeren während der Gelelektrophorese hinweist, und kommt nicht wie erwartet ausschließlich als Monomer vor. Des Weiteren erkennt man auch, dass Chl-mBoWSCPhis neben den Tetrameren weitaus weniger höher oligomere Zustände ausbildet als Chl-BoWSCPhis und sich viel eher wie das native Protein verhält (der Laufunterschied zwischen den rekombinanten WSCPs und dem nativen WSCP ist vermutlich auf die vier Hexahistidylreste, die das rekombinante Tetramer zusätzlich besitzt, zurückzuführen). Es sollte noch vermerkt werden, dass hier zwar ein Molekulargewichts-Marker im Gel mitläuft, dieser jedoch nur als ungefährender Anhaltspunkt dienen kann, da es sich um eine native und keine denaturierende PAGE handelt und somit die Proteinlaufeigenschaften nicht ausschließlich von der Größe der Moleküle abhängen.

In Abb. 4-15 c) sieht man deutlich, dass unter sehr schonenden Elektrophoresebedingungen nun auch die unpigmentierten Komplexe ähnliche Laufeigenschaften aufweisen wie die Chl-Protein-Komplexe, vor allem Apo-mBoWSCPhis (Probe „am“). Unpigmentiertes BoWSCPhis (Probe „a“) läuft zwar auch als höheres Oligomer, allerdings zeigen sich dabei nur zwei Proteinbanden, die eindeutig höher laufen als die Tetramerbande (Pfeil) der Chl-WSCP-Komplexe. Chlid-WSCP zeigt seine Hauptbande auf Höhe der Tetramere, weist aber auch wieder einen undeutlichen, „verschmierten“ Proteinuntergrund auf wie bereits bei b). In diesem Gel sieht man auch wieder die große Ähnlichkeit zwischen Chl-mBoWSCPhis und nativen BoWSCP – beim nativen Protein ist hier jetzt ebenfalls eine höher oligomere Proteinbande (schwach) zu erkennen.

Betrachtet man nun in Abb. 4-16 die Chlid- bzw. die Chl-Fluoreszenz (rechts) der Komplexe, die mit Deriphat-Laufpuffer bzw. mit detergensfreiem Puffer aufgetrennt wurden, so kann man vor allem beim Chlid-WSCP (*cd*) deutlicher als bei den Coomassie-gefärbten Gelen (links) erkennen, wo genau sich die noch pigmentierten Komplexe in der Gelmatrix bewegen.



Chlid-WSCP zeigt zwar auf Proteinebene (Coomassiefärbung, Abb. 4-16, links) einen diffusen Verlauf, auf der Fluoreszenzaufnahme ist jedoch eine recht definierte Anordnung der pigmentierten Komplexe zu erkennen. Interessant ist vor allem das Ergebnis der PAGE mit Deriphat-Laufpuffer (A) – dort sieht man auf der Fluoreszenzaufnahme bei den Chl-Komplexen (*c*, *cm* und *n*) schwach eine fluoreszierende Bande, mit einer Laufstrecke, die zwischen den Monomeren (links, *a* und *am*) und den Tetrameren (Hauptbande bei *c*, *cm* und *n*) liegt. Die pigmentierte Bande von Chlid-WSCP läuft auf etwa gleicher Höhe wie diese Bande und deutet darauf hin, dass unter diesen Bedingungen das Chlid-WSCP aus dem tetrameren Zustand in eine niedrigere pigmentierte Oligomerisierungsform zerfällt, die jedoch höher als ein Monomer ist – vermutlich ein Dimer. In Abb. 4-16 A sieht man außerdem deutlich, dass Chlid-WSCP nicht nur auf Proteinebene zerfällt, sondern auch, dass unter diesen etwas stringenteren Bedingungen die Komplexe einen großen Anteil an Pigment verlieren, der als fluoreszierende Bande unten in der Lauffront des Gels zu erkennen ist. Chl-WSCP ist deutlich stabiler und zeigt außer der schwachen Dimer(?) -Fluoreszenzbande keine Anzeichen von Zerfall oder Pigmentverlust.

Bei der nativen detergensenfreien PAGE (Abb. 4-16 B) zeigt die Fluoreszenzaufnahme, dass sich Chlid-WSCP genauso verhält wie Chl-WSCP, es bildet sogar neben den Tetrameren auch höhere Oligomere aus, die auf dem Coomassie-gefärbten Gel nicht zu erkennen sind. Allerdings befindet sich zwischen der Tetramerbande und der Bande der höheren Oligomere ein diffuser „Schmier“, der bei den Chl-WSCP-Komplexen nicht vorhanden ist. Ein Pigmentverlust des Chlid-WSCPs ist hier im Gegensatz zur in A gezeigten Deriphat-PAGE nicht zu erkennen.

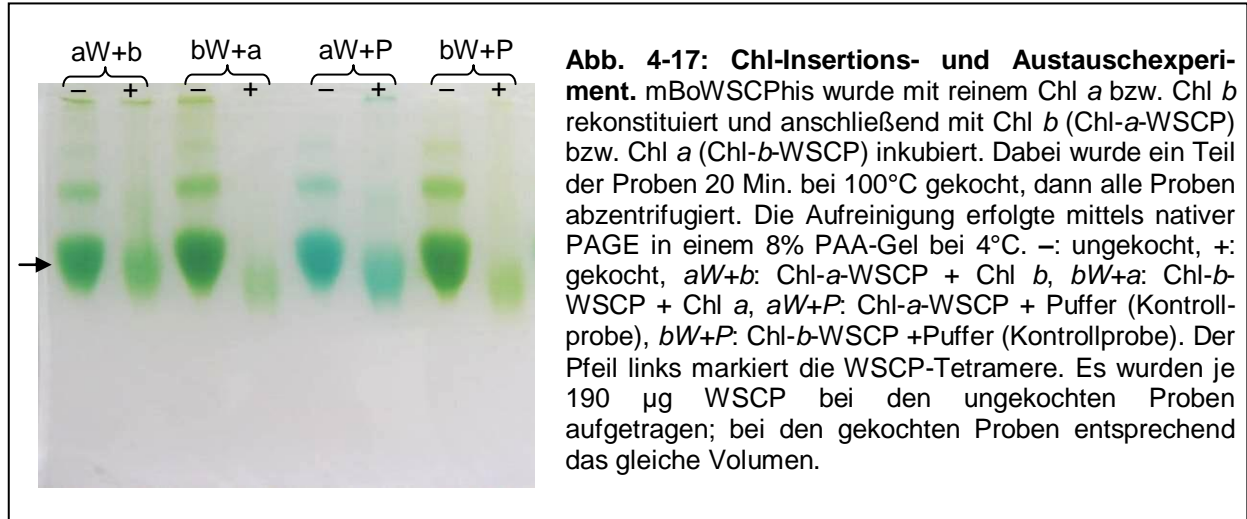
Unter ausreichend schonenden Bedingungen bilden nach diesen Ergebnissen demnach – entgegen bisherigen Angaben – auch die WSCP-Apoproteine sowie Chlid-WSCP Tetramere und/oder höhere Oligomere aus, die allerdings weniger Stabilität besitzen als Chl-WSCP-Komplexe.

4.1.8 Chl-/Chlid-Insertions- und Austauschversuche

Da Chl-WSCP so außerordentlich stabil ist und selbst bei starker Hitze sowie extremen pH-Bedingungen seine gebundenen Pigmente schützt (vgl. 4.1.7), und zudem die gebundenen Chlorophylle Energieübertragung zeigen (4.1.6.3), wäre es ein interessantes Protein beispielsweise für die technische Anwendung in künstlichen Lichtsammelanlagen. Der große Nachteil dabei ist aber der geringe Chl-Gehalt der Komplexe. Theoretisch besitzen die Blumenkohl-WSCP-Tetramere vier Chl-Bindestellen, und auch in einigen WSCP-Komplexen aus anderen Pflanzen sind vier Chl pro Tetramer gebunden (z.B. WSCP aus *Lepidium virginicum*, Horigome *et al.*, 2007). Laut Literatur und auch nach eigenen Analysen (s. 4.1.4) sind jedoch nur zwei Chlorophylle pro Tetramer des Blumenkohl-WSCPs gebunden.

Es sollte also versucht werden, die Chl-Bindungsstellen im rekombinanten Blumenkohl-WSCP abzusättigen, d.h. eine Erhöhung des Chl/Protein-Verhältnisses auf 4 Chl/Tetramer zu erzielen. Dazu wurde Chl-*a*-WSCP mit Chl *b* inkubiert und umgekehrt, einmal bei RT und einmal unter Hitzeeinwirkung (20 Min. kochen). Die Hitzebehandlung diente dazu, die kinetische Energie zu erhöhen in der Hoffnung, die sehr stabilen, kompakten Pigment-Protein-Komplexe „aufzulockern“ und somit eine weitere Pigmentinsertion zu erleichtern.

Anschließend wurden die Ansätze abzentrifugiert und schließlich mittels nativer PAGE aufgetrennt bzw. aufgereinigt. Es wurde alternativ eine Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation in Saccharosedichtgradienten durchgeführt, die vergleichbare Ergebnisse brachte.



In Abb. 4-17 kann man allein anhand der Färbung der Pigment-Protein-Komplexe sehen, dass es gelungen ist, bei den Chl-*a*-WSCP-Komplexen Chl *b* zu binden und umgekehrt. Die charakteristische blaugrüne Farbe der Chl-*a*-WSCP-Kontrolle (aW+P) hat sich nach der Inkubation mit Chl *b* deutlich in einen gelblicheren Grünton verändert. Etwas weniger deutlich, aber trotzdem sichtbar, hat sich die gelbgrüne Farbe der Chl-*b*-WSCP-Kontrolle (bW+P) in einen leicht bläulichen Ton verändert nach der Inkubation mit Chl *a*. Das betrifft in beiden Fällen sowohl die bei RT als auch die bei 100°C behandelten Proben. Die HPLC-Analyse der aus den Komplexen extrahierten Pigmente bestätigte dieses Ergebnis.

Es blieb nun noch die Frage offen, ob es lediglich einen Pigmenttausch gegeben hatte, oder ob es tatsächlich gelungen war, in den Chl-*a*-WSCP-Komplexen *zusätzlich* Chl *b* zu binden und umgekehrt. Dazu war es wichtig, eine möglichst genaue Methode zur Bestimmung der Pigment- bzw. der Proteinkonzentration zu haben (vgl. 4.1.4). Mit der in Abschnitt 4.1.4 besprochenen Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration über Korrektur des Absorptionswertes bei 280 nm konnten jedoch keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden.

Die in Abb. 4-17 gezeigte Proben konnten nicht weiter analysiert werden, da es einerseits nicht bei allen Proben möglich war, sie vollständig aus dem PAA-Gel zu extrahieren, und andererseits gab es bei fast allen Proben starke Streuung der Absorption im UV-Bereich, vermutlich bedingt durch winzige Partikel des PAA-Gels, die nicht durch Zentrifugation entfernt werden konnten. Nur die parallel angesetzten Proben, die nach der Chl-Zugabe mittels Ultrazentrifugation aufgereinigt wurden, konnten weiter untersucht werden, aber auch hier war es schwierig, die Ergebnisse zu deuten (s. unten). Außerdem fehlen bei diesen Proben die mit 100°C behandelten Kontrollproben, da aus technischen Gründen nur sechs Proben mittels Ultrazentrifugation aufgereinigt werden konnten und somit jeweils nur eine der

beiden Kontrollproben weiterverarbeitet wurde. Die Ergebnisse aus der Analyse dieser Proben sind in nachfolgender Tabelle dargestellt:

Probe	Chl a/b	Chl/Protein
aW+b (-)	2,1	0,86
aW+b (+)	1,0	0,99
bW+a (-)	0,3	0,95
bW+a (+)	(0,7)	k.A.
aW+P (-)	a	0,70
bW+P (-)	b	0,97

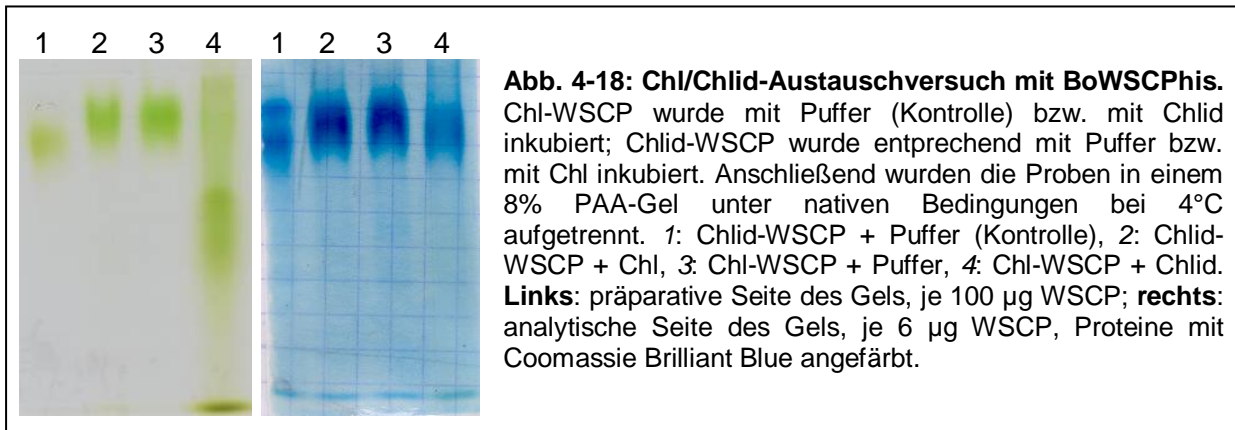
Tab. 4-4: Auswertung des Chl-Insertions und -austausch-experiments. Dargestellt ist die Auswertung derjenigen Proben, die wie die in Abb. 4-17 beschriebenen Proben hergestellt wurden, jedoch anschließend mittels Ultrazentrifugation in detergensfreien Saccharosedichtegradienten aufgereinigt wurden. Die Probenbezeichnung ist analog zu Abb. 4-17. Die Chl-Konzentration sowie das Chl-a/b-Verhältnis wurden mittels HPLC-Analyse bestimmt nach quantitativer Extraktion der Pigmente mit Butanol (s. 3.1.9.1.2). Die Proteinkonzentration wurde über den molaren Extinktionskoeffizienten bei 280 nm bestimmt, nach Subtraktion des Chl-Absorptionsanteils bei 280 nm. Dazu wurde das Absorptionsspektrum von freiem Chl (in Ethanol) wie in 4.1.4 beschrieben auf die Gesamtabsorption im q_x/q_y -Bereich des Chl-WSCP-Spektrums normiert. k.A.: keine Angabe möglich.

In Tab. 4-4 sieht man, dass das Chl-a/b-Verhältnis bei allen vier Chl-Insertionsproben sehr niedrig ist. So haben die beiden Chl-a-WSCP-Proben (aW+b) relativ viel des beim Insertionsversuch angebotenen Chl b angenommen, die Chl-b-WSCP-Proben (bW+a) hingegen relativ wenig des angebotenen Chl a. Bei der Chl-b-WSCP-Probe, der unter Hitzebehandlung Chl a angeboten wurde (bW+a (+)), sind die Chlorophylle entweder während des Kochens der Probe oder bei der Pigmentextraktion für die HPLC-Analyse so stark derivatisiert, dass sie über die HPLC-Analyse nicht mehr quantifiziert werden konnten – auch das Chl-a/b-Verhältnis ist nur anhand der Derivate geschätzt und daher in Klammern aufgeführt. Das insgesamt sehr niedrige Chl-a/b-Verhältnis bei den Chl-Insertionsproben erschwert die Bestimmung des Chl/Protein-Verhältnisses, da sich bei stark Chl-b-haltigen WSCP-Proben gezeigt hat, dass es hierbei zu Abweichungen kommt (s. 4.1.4).

Beim Chl/Protein-Verhältnis fällt auf, dass fast alle Werte nahezu bei 1 liegen. Normalerweise liegen die Werte bei ca. 0,5 (vgl. 4.1.4). Ziel dieses Versuchs war, wie bereits oben erwähnt, alle Chl-Bindungsstellen im WSCP-Tetramer abzusättigen, wodurch sich ein Chl/Protein-Verhältnis von 1 ergibt. Obwohl bei den drei auswertbaren Chl-Insertionsproben in Tab. 4-4 alle Chl/Protein-Verhältnisse deutlich über 0,5 liegen – zwei davon ungefähr bei 1 – sieht man, dass auch die Chl/Protein-Verhältnisse der beiden Kontrollproben über 0,5 liegen bzw. bei ca. 1 bei der Chl-b-WSCP Kontrollprobe. Es handelt sich bei diesen Proben um dieselben Chl-a- bzw. Chl-b-WSCP-Proben, bei denen in Tab. 4-2 ein Chl/Protein-Verhältnis von 0,40 (Chl-a-WSCP) bzw. 0,83 (Chl-b-WSCP) angegeben ist. Diesen Proben wurde hier nur Puffer und nicht zusätzliches Chl angeboten, daher wurde erwartet, dass sich ihr Chl/Protein-Verhältnis nicht ändert. Aufgrund der Tatsache, dass auch die Kontrollproben ein im Vergleich zu vor dem Versuch erhöhtes Chl/Protein-Verhältnis aufweisen, kann hier demnach bei den Chl-Insertionsproben keine eindeutige Aussage gemacht werden, ob zusätzlich zu dem bereits gebundenen Chl weiteres Pigment gebunden wurde.

Eine weitere interessante Fragestellung in diesem Zusammenhang war, ob es möglich ist, das gebundene Chl gegen Chlid auszutauschen und umgekehrt, und dabei gleichzeitig eine reversible Mono- und Tetramerisierung zu erreichen. Dazu wurden die Chlid- bzw. Chl-WSCP-Komplexe wie oben bereits beschrieben mit dem jeweils anderen Pigment inkubiert

(hier jedoch nur bei RT, es erfolgte keine Hitzebehandlung da Chlid-WSCP nicht hitzestabil ist (vgl. 4.1.7.1)) und anschließend mittels nativer PAGE aufgetrennt.



Das Ergebnis dieses Pigmentaustauschversuchs ist in Abb. 4-18 dargestellt. Man sieht, dass Chlid-WSCP (links, 1) unter den gewählten Versuchsbedingungen eine etwas höhere Mobilität in der Gelmatrix aufweist als Chl-WSCP (links, 3), jedoch ist der Unterschied nicht so stark wie zwischen Monomeren und Tetrameren erwartet (vgl. Abb. 4-15, b). Hier sollte allerdings erwähnt werden, dass die Elektrophoresebedingungen in diesem Fall nicht so stringent waren (detergensfreier Laufpuffer) wie in Abb. 4-15 b (Deriphat-Laufpuffer). Aus technischen Gründen war es jedoch zu dem Zeitpunkt nicht möglich, Deriphat-Puffer zu verwenden – eine Wiederholung dieses Experiments unter Verwendung von Deriphat-Puffer wäre demnach sinnvoll. In der Coomassie-gefärbten Ansicht des Gels (Abb. 4-18, rechts) kann man erkennen, dass sich die Chlid-WSCP-Probe (rechts, 1) in zwei in etwa gleich starke Proteinbanden aufteilt: die untere läuft etwas weiter im Gel als die entsprechende Proteinbande der Chl-WSCP Kontrollprobe (rechts, 3) und stellt das pigmentierte Protein dar. Die obere Bande stellt unpigmentiertes Protein dar und ist dementsprechend im ungefärbten Gel (links) nicht sichtbar.

Die Chlid-WSCP-Probe, der Chl angeboten wurde (2), ist vom Laufverhalten im Gel nicht von der Chl-WSCP-Kontrolle zu unterscheiden, weder beim Betrachten der pigmentierten Komplexe (links) noch bei Betrachtung der angefärbten Proteine (rechts). Hier scheint der Pigmentaustausch erfolgreich gewesen zu sein. Auch die HPLC-Analyse der in den Komplexen enthaltenen Pigmente bestätigte den fast vollständigen Austausch des gebundenen Chlids gegen Chl.

Anders sieht es beim Chl-WSCP aus, dem Chlid angeboten wurde (Abb. 4-18, 4). Hier sieht man beim ungefärbten Gel einen starken grünen Hintergrund, der sich beinahe über die gesamte Bahn verteilt und nach HPLC-Analyse als Chlid entpuppte, mit einer sehr breiten „Bande“ in etwa der Mitte des Gels. Vergleicht man dazu das Coomassie-gefärbte Gel so sieht man, dass diese breite grüne Bande kein Protein enthält, sondern sich die Proteinbande oben im Gel auf ungefähr der gleichen Höhe wie die Proteinbande der Chl-WSCP Kontrollprobe (3) befindet. Auch die CD-spektroskopische Analyse der aus den Banden extrahierten Proteine zeigte, dass sich bei dieser Probe Pigment-Protein-Komplexe nur in der oberen Bande befinden (Daten nicht gezeigt), auch wenn diese auf dem ungefärbten Gel (links) aufgrund des starken Hintergrundes nur zu erahnen sind. Die HPLC-

Analyse zeigte, dass es nicht gelungen ist, das gebundene Chl gegen Chlid auszutauschen. Es wurde zwar etwas Chlid in den aus der oberen Bande extrahierten Komplexen gefunden, es kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob dieses gebunden vorliegt oder nur von der Chlid-Verunreinigung stammt.

Die Ergebnisse des Chl/Chlid-Austauschversuchs sind in nachfolgender Tabelle noch einmal zusammengefasst:

	Austausch	Vollständig
ChlW+Chlid	(+)	-
ChlidW+Chl	+	(+)

Tab. 4-5: Übersicht über die Ergebnisse der Chl/Chlid-Austauschversuche mit BoWSCP_{His}. *ChlW*: Chl-WSCP, *ChlidW*: Chlid-WSCP. Die Klammer weist auf ein unsicheres Ergebnis hin.

4.1.9 Sekundärstruktur von Apo- bzw. Chl-BoWSCP

Die bisherigen Untersuchungen zur Stabilität von WSCP haben ergeben, dass mit Chl pigmentiertes WSCP sehr stabil ist (s. 4.1.7) – es widersteht Hitzebehandlung bei 100°C, ist sehr pH-stabil und verbleibt in seiner tetrameren bzw. höher oligomeren Form selbst unter stringenteren Elektrophoresebedingungen. Das unpigmentierte Protein hingegen ist wesentlich weniger stabil – es denaturiert beim Kochen (s. 4.1.7.1) und die oligomere Form zerfällt bei nativer PAGE unter etwas stringenteren Bedingungen in Monomere (s. 4.1.7.3). Die Ergebnisse der nativen PAGE zeigten jedoch auch, dass Apo-WSCP unter schonenden Bedingungen eine vergleichbare PAGE-Mobilität aufweist wie Chl-WSCP, was darauf hinweist, dass auch das unpigmentierte Protein in diesem Fall als Tetramer bzw. höheres Oligomer vorkommt.

Um festzustellen, ob das Apoprotein die gleiche Struktur annimmt wie Chl-WSCP und somit die Bindung der Chlorophylle alleine für die hohe Stabilität der Komplexe verantwortlich ist, wurden CD-Spektren der verschiedenen WSCP-Formen im UV-Bereich (190-240 nm) gemessen. Die drei möglichen Sekundärstrukturen von Proteinen (α -Helix, β -Faltblatt und Zufallsknäuel) weisen jeweils charakteristische CD-Spektren im UV-Bereich auf. Diese unterschiedlichen Absorptionseigenschaften verhalten sich additiv, so dass sich das UV-CD-Spektrum eines Proteins aus der Summe der einzelnen Spektren der enthaltenen Sekundärstrukturen ergibt. Somit kann das Proteinspektrum anschließend mittels einer speziellen Software (Erläuterungen s. 3.1.15.2.2) analysiert werden, welche das gemessene Spektrum mit Spektren von Proteinen bekannter Struktur vergleicht und mit geeigneten Algorithmen die relativen Anteile der drei Sekundärstrukturen herausrechnet.

Es wurden UV-CD-Spektren der unpigmentierten und mit Chl pigmentierten Form des Volllängenproteins sowie des C-terminal verkürzten WSCPs gemessen, um außerdem festzustellen, ob der C-Terminus einen entscheidenden Einfluss auf die Struktur des Proteins hat. In Abb. 4-19 sind die Spektren abgebildet. Die durchgezogene Linie stellt jeweils das gemessene Spektrum dar, die gestrichelte Linie zeigt den jeweils vom Analyseprogramm (s.

3.1.15.2.2) berechneten „Fit“. Die Spektren sind in der Einheit $\Delta\epsilon$ dargestellt, d.h. sie sind normiert auf die molare Absorption pro Aminosäurerest.

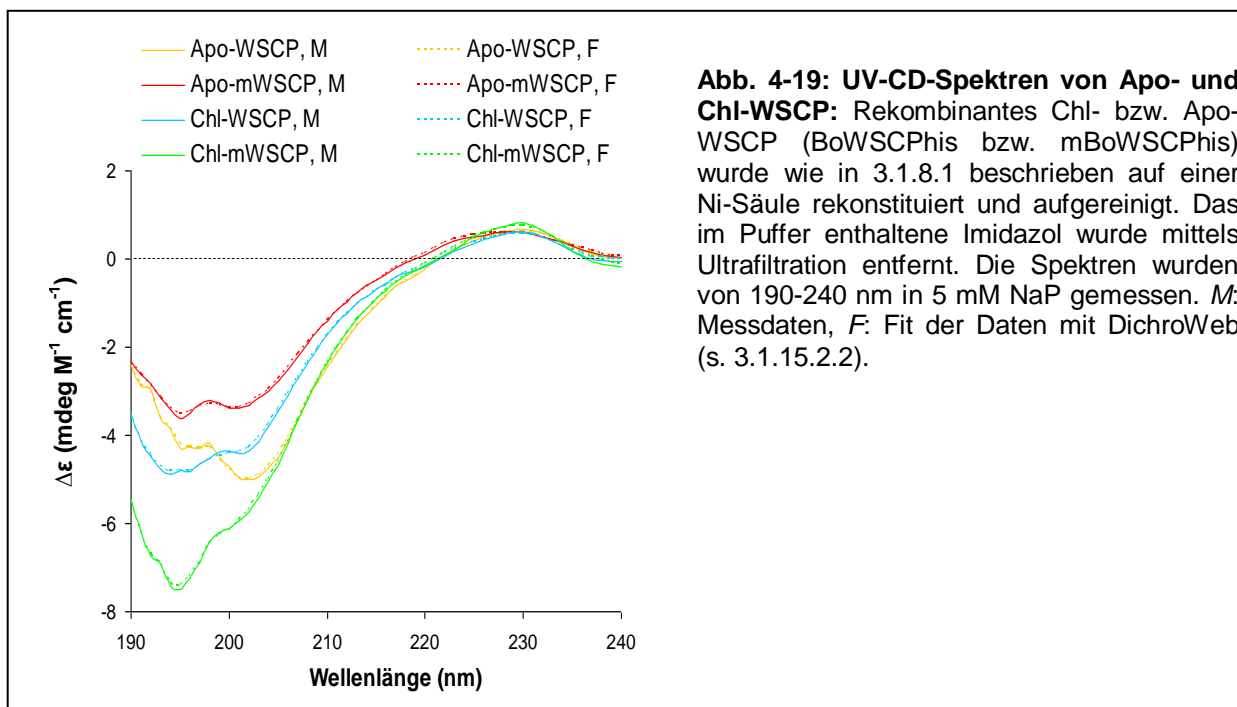


Abb. 4-19: UV-CD-Spektren von Apo- und Chl-WSCP: Rekombinantes Chl- bzw. Apo-WSCP (BoWSCP_{His} bzw. mBoWSCP_{His}) wurde wie in 3.1.8.1 beschrieben auf einer Ni-Säule rekonstituiert und aufgereinigt. Das im Puffer enthaltene Imidazol wurde mittels Ultrafiltration entfernt. Die Spektren wurden von 190-240 nm in 5 mM NaP gemessen. *M*: Messdaten, *F*: Fit der Daten mit DichroWeb (s. 3.1.15.2.2).

Die Analyse ergab für alle Spektren sehr gute Übereinstimmung mit den vom Analyseprogramm entsprechenden kalkulierten Spektren („Fits“, gestrichelte Spektren in Abb. 4-19). Ein Maß für die Abweichung ist der NRMSD („*normalized root mean square deviation*“). Liegt dieser Wert unter 0,1, stimmen die kalkulierten Spektren sehr gut mit den experimentell gemessenen Daten überein (Mao *et al.*, 1982; Lobley *et al.*, 2002). Die NRMSD-Werte für die hier abgebildeten Spektren sind in Tab. 4-6 angegeben und liegen alle weit unter 0,1.

Man sieht in Abb. 4-19 deutlich, dass die Spektren der vier WSCP-Formen sich sowohl in ihrer Amplitude als auch in ihrer Form voneinander unterscheiden. Beim Vergleich der Spektren des pigmentierten mit denen des unpigmentierten Proteins fällt auf, dass beim pigmentierten (m)WSCP das Hauptminimum bei ca. 195 nm liegt und bei ca. 201 nm lediglich eine Schulter zu sehen ist, während sich das Spektrum des unpigmentierten Vollängenproteins (Apo-WSCP, hellorange) umgekehrt verhält. Beim unpigmentierten, C-terminal verkürzten WSCP (Apo-mWSCP, rot), sind die beiden Minima ungefähr gleich stark ausgeprägt. Das native, mit Chl pigmentierte Blumenkohl-WSCP konnte hier leider nicht als Vergleich dienen, da es nicht in völlig reiner Form isoliert werden konnte (vgl. 4.1.1). Würde man anhand der bisherigen Erfahrungen und Ergebnisse mit diesen verschiedenen rekombinanten WSCP-Formen eine Reihenfolge aufstellen, angefangen mit dem Protein, welches sich dem nativen Protein am ähnlichsten verhält (Stabilität, PAGE-Mobilität, etc.), würde dies wie folgt aussehen: Chl-mWSCP > Chl-WSCP > Apo-mWSCP > Apo-WSCP. Solch eine Abfolge kann man auch in den UV-CD-Spektren entdecken, wenn man die Form anschaut: bei Chl-mWSCP ist das Minimum bei 195 nm am stärksten ausgeprägt im

Vergleich zum Signal bei 201 nm, danach folgen ChI-WSCP, Apo-mWSCP und schließlich Apo-WSCP.

Trotz der augenscheinlich großen Unterschiede zwischen den Spektren ergab die computer-gestützte Analyse interessanterweise im Mittel bei allen vier Spektren ungefähr gleiche Anteile der jeweiligen Sekundärstrukturen. Wie dies trotz der unterschiedlichen CD-Spektren sein kann, und was die möglichen Gründe für diese starken Unterschiede sein könnten, wird in 5.1.2 diskutiert. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle dargestellt, zusammen mit der jeweiligen Standardabweichung.

Tab. 4-6: Relative Sekundärstrukturanteile bei unpigmentiertem und pigmentiertem rekombinantem BoWSCP. Die gemessenen UV-CD-Spektren aus Abb. 4-19 wurden mit dem Programm DichroWeb analysiert, welches die relativen Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturen aus den Spektren berechnet (näheres s. 3.1.15.2.2). Die angegebenen Werte beziehen sich auf den jeweils von DichroWeb berechneten „Fit“ (gestrichelte Spektren in Abb. 4-19). Angegeben ist jeweils der Mittelwert aus allen zulässigen Ergebnissen, und in Klammern die zugehörige Standardabweichung. *ChI-mWSCP*: n = 99, *ChI-WSCP*: n = 193, *Apo-mWSCP*: n = 206, *Apo-WSCP*: n = 177. NRMSD: „normalized root mean square deviation“, ein Maß für die Abweichung zwischen gemessenem und kalkuliertem Spektrum (sollte < 0,1 sein).

	Helix	Strang	Schleife	ungeordnet	Summe	NRMSD
ChI-mWSCP	0,08 (0,07)	0,32 (0,16)	0,24 (0,09)	0,34 (0,12)	0,98 (0,03)	0,011
ChI-WSCP	0,07 (0,06)	0,33 (0,12)	0,25 (0,08)	0,33 (0,09)	0,99 (0,03)	0,016
Apo-mWSCP	0,07 (0,07)	0,38 (0,11)	0,22 (0,07)	0,31 (0,08)	0,98 (0,03)	0,017
Apo-WSCP	0,10 (0,08)	0,33 (0,14)	0,23 (0,10)	0,33 (0,10)	0,99 (0,03)	0,012

Innerhalb aller gültigen Ergebnisse (Gültigkeitskriterien s. 3.1.15.2.2), die das Analyseprogramm für jedes der WSCP-Formen berechnet hat, gab es stark variierende Werte. Dies spiegelt sich in den hohen Standardabweichungen in Tab. 4-6 wider. Auf der Internet-Seite des Analyseprogramms ist angegeben, dass die Genauigkeit der Sekundärstrukturanalyse aus UV-CD-Spektren für α -helikale Proteine bei ca. 95% liegt, jedoch nur etwa zwischen 50 und 75% für Proteine, die aus β -Strängen, Schleifen und ungeordneten Strukturen bestehen (wie WSCP).

Der aus den UV-CD-Spektren berechnete β -Strang-Anteil von 30-40% stimmt gut überein mit den von Horigome *et al.* (2007) ermittelten Daten aus der Kristallstruktur von WSCP aus *Lepidium virginicum* (LvWSCP). Dieses WSCP besitzt ca. 41% Sequenzidentität mit BoWSCP. LvWSCP enthält jedoch keine helikalen Bereiche. Aus den UV-CD-Daten von BoWSCP wurde ein helikaler Anteil von 7-10% vorhergesagt (Tab. 4-6), allerdings liegt bei

diesen Angaben die Standardabweichung zwischen 80 und 100%. Eine Strukturvorhersage aus der Aminosäuresequenz von BoWSCP mit dem Programm SwissModel ergab eine kurze Helix aus drei Aminosäureresten im WSCP-Monomer (Daten nicht gezeigt).

Neben den hier dargestellten Daten ergaben die Berechnungen außerdem für alle gemessenen WSCP-Formen, dass die Anzahl der β -Strang Segmente zwischen 5,7 und 6,4 pro 100 Aminosäurereste liegt (genauen Werte s. 8.5). Das WSCP_{His}-Monomer hat eine Länge von 210 AS, das mWSCP_{His}-Monomer ist 200 AS lang – somit ergibt sich eine Anzahl von ca. 12 bis 13 β -Strängen im Monomer. Diese Ergebnisse passen zu den Strukturdaten von Horigome *et al.* (2007), die die Kristallstruktur von WSCP aus *Lepidium virginicum* bei 2 Å auflösen konnten und 12 β -Stränge pro Monomer gefunden haben.

Die Analyse der CD-Spektren konnte zwischen pigmentiertem und unpigmentiertem WSCP keine signifikanten Unterschiede in der Sekundärstruktur feststellen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass auch das unpigmentierte WSCP bereits weitestgehend „nativ“ gefaltet vorliegt. Dies würde bedeuten, dass die extrem hohe Stabilität der Chl-WSCP-Komplexe alleine durch die Bindung der Chl-Moleküle zustande kommt.

4.1.10 Biochemische Untersuchungen zu rekombinantem WSCP aus *Arabidopsis thaliana*

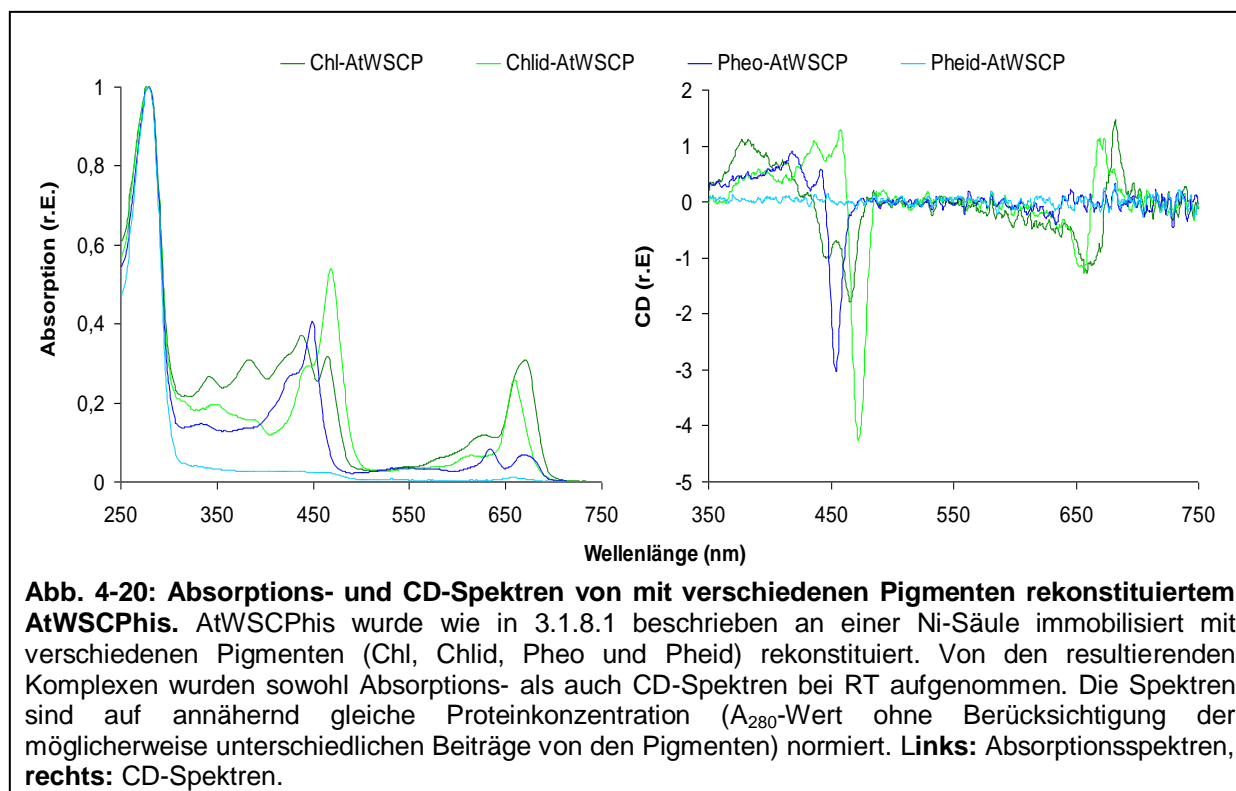
Die bisher beschriebenen Ergebnisse beziehen sich nur auf WSCP aus Blumenkohl. Das rekombinante WSCP aus *Arabidopsis thaliana* (im Folgenden als AtWSCP_{His} bezeichnet) konnte ebenfalls in *E. coli* exprimiert werden und wurde vergleichend zum Blumenkohl-WSCP bezüglich seines Pigmentbindungsverhaltens, seiner Stabilität und seines Oligomerisierungsverhaltens untersucht. Natives AtWSCP konnte in diesem Fall nicht als Vergleich herangezogen werden, da es im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen ist, das native WSCP aus den Blättern von *Arabidopsis thaliana* zu isolieren (näheres hierzu s. 4.2.3).

4.1.10.1 Chl-Bindungsspezifität von AtWSCP_{His}

Dass auch das rekombinante *Arabidopsis*-WSCP Chl binden kann, wurde bereits unter Anleitung der Autorin im Rahmen der Diplomarbeit von Andrea Weil (2007) festgestellt. Das Protein scheint jedoch eine niedrigere Affinität für Chl zu besitzen als BoWSCP_{His}. Um deshalb der Frage nachzugehen, ob die Chl- bzw. Chlid-Bindung durch AtWSCP_{His} spezifisch ist, wurde dem Apoprotein neben Chl und Chlid außerdem Pheophytin (Pheo) und Pheophorbid (Pheid) zur Rekonstitution angeboten, da von Blumenkohl-WSCP bekannt ist, dass das zentrale Mg-Atom essentiell für die Bindung des Pigments ist. Blumenkohl-WSCP bindet demnach kein Pheophytin bzw. Pheophorbid (Schmidt *et al.*, 2003).

In Abb. 4-20 sind die nach der Rekonstitution gemessenen Absorptions- und CD-Spektren abgebildet. Bei beiden sieht man, dass neben Chl und Chlid entgegen den Erwartungen auch anscheinend Pheophytin von AtWSCP_{His} gebunden wurde. Pheophorbid wurde jedoch nicht gebunden, oder nur so schwach, dass man im Absorptionsspektrum lediglich das Pigmentspektrum erahnen kann.

Die HPLC-Analyse der aus den Pheo-Komplexen extrahierten Pigmente ergab, dass nicht nur das angebotene Pheo *a* und Pheo *b* enthalten war, sondern vor allem ein unbekanntes Pigment-Derivat vom Protein gebunden wurde (ca. 50% vom Gesamtpigment), das als freies Pigment seine Hauptabsorptionsmaxima bei 444 nm und 635 nm besitzt (im Vergleich dazu: Pheo *a*: 407 und 668 nm, Pheo *b*: 434 und 656 nm) und polarer ist als die Pheophytine *a* und *b*. Dieses Derivat befand sich schon in Spuren (ca. 0,3% vom Gesamtpigment) im Pheophytin, das für die Rekonstitution verwendet wurde, und wurde demzufolge scheinbar selektiv von AtWSCP his gebunden. Beim Vergleich mit anderen HPLC-Daten fand sich dieses Derivat auch bei Pigmentextrakten aus Chl-*b*-WSCP und wurde dort als vermutliches OH-Chl *b* klassifiziert. Das freie Pheophytin, mit dem die Rekonstitution durchgeführt wurde, war demnach wahrscheinlich zu ca. 0,3% mit einem Chl-Derivat verunreinigt.



Vergleicht man das Absorptionsspektrum von Chl-AtWSCP his mit dem von Chl-BoWSCP his (Abb. 4-7) so kann man erkennen, dass das Verhältnis vom Rotmaximum (Chl-Absorption) zum UV-Maximum (Proteinabsorption) beim *Arabidopsis*-WSCP deutlich kleiner ist. Das spiegelt sich auch im errechneten Pigment/Protein-Verhältnis wieder: während es bei Chl-BoWSCP his bei ca. 0,5 liegt, ist der Wert bei AtWSCP his mit ca. 0,3 viel niedriger.

Beim Betrachten der CD-Spektren fällt auf, dass die im q_y -Bereich vorkommenden Signale bei Pheo-AtWSCP his viel schwächer ausgeprägt sind als bei Chl- und Chlid-AtWSCP his, bei vergleichbar intensivem Signal im Soret-Bereich. Die CD-Spektren von Chl- bzw. Chlid-AtWSCP his ähneln sehr den entsprechenden CD-Spektren von BoWSCP his (vgl. 4.1.6.2 und Weil, 2007) und lassen daher einen vergleichbaren Pigmentbindungsmodus vermuten.

In Tab. 4-7 sind die in den Absorptions- und CD-Spektren ersichtlichen Maxima und Minima der Pigment-Protein-Komplexe aufgeführt.

Tab. 4-7: Absorptionsmaxima und CD-Maxima und -Minima von unterschiedlich pigmentierten AtWSCPhis-Komplexen. Die angegebenen Wellenlängen beziehen sich auf die Spektren in Abb. 4-20. Alle Werte sind in nm angegeben. Aufgeführt sind nur die Maxima/Minima im Spektralbereich 340-750 nm. *kursiv*: nicht eindeutig bestimmbar, (+): Maximum, (-): Minimum.

Absorptionsspektren von AtWSCPhis mit:			CD-Spektren von AtWSCPhis mit:		
Chl	Chlid	Pheo	Chl	Chlid	Pheo
670	659	669	682 (+)	671 (+)	646 (+)
628	614	634	659 (-)	656 (-)	634 (-)
465	468	575	466 (-)	472 (-)	454 (-)
438	445	548	446 (-)	458 (+)	442 (+)
383	387	449	411 (+)	436 (+)	418 (+)
342	349	428	381 (+)	391 (+)	
		381			

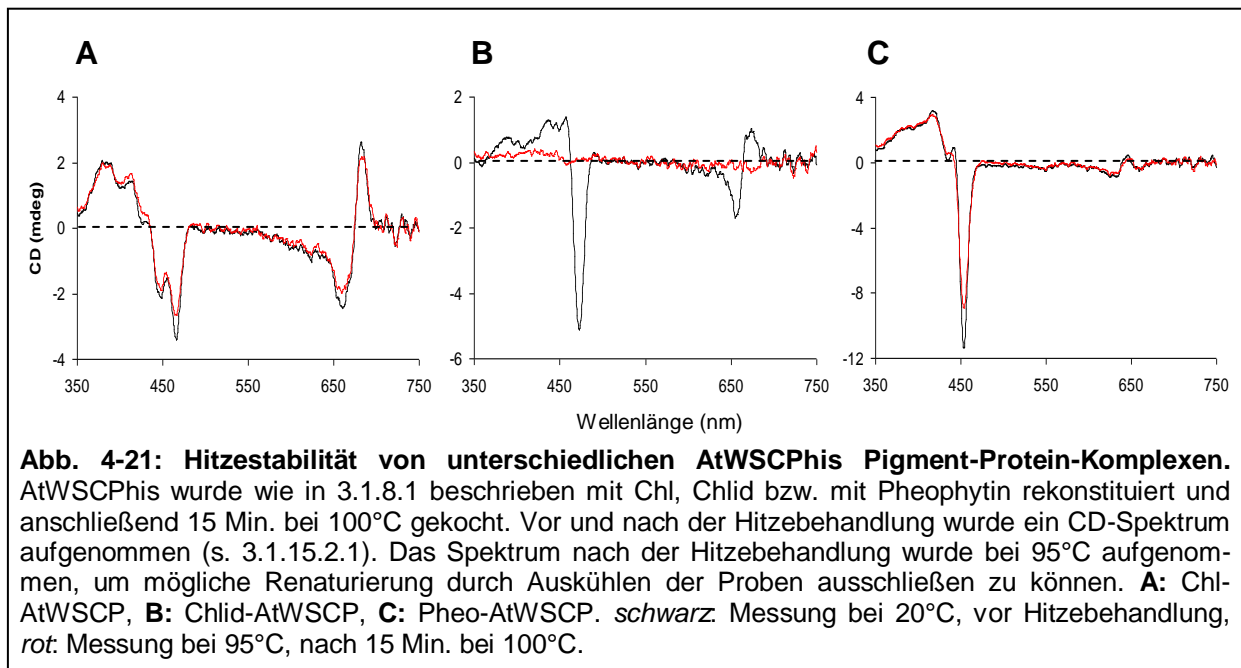
Beim Vergleich der Lage der Absorptionsmaxima von Chl-AtWSCPhis mit denen von Chl-BoWSCPhis (vgl. 4.1.2.2) findet man eine recht gute Übereinstimmung – die leichte Blauverschiebung des Rotmaximums nach 670 nm (im Vergleich: 673 nm bei Chl-BoWSCPhis) ist vermutlich auf einen höheren Chl-*b*-Gehalt zurückzuführen. Die Chl-*b*-Absorptionsbande im Soret-Bereich, die bei Chl-BoWSCPhis bei ca. 460 nm liegt, ist hier um ca. 5 nm in den längerwelligen Bereich verschoben und liegt bei 465 nm. Bei Chlid-AtWSCPhis, welches dem Spektrum nach zu urteilen fast ausschließlich Chlid *b* gebunden hat, liegt dieser Peak sogar bei 468 nm. Bei der HPLC-Analyse der Pigmentausrüstung von Chlid-AtWSCPhis konnte tatsächlich nur Chlid *b* detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass Chlid *a* ebenfalls gebunden wurde (bei der Rekonstitution wurden Chlid *a* und *b* in äquimolaren Mengen angeboten), die Menge jedoch unter der Nachweisgrenze lag.

Auch die Lage der Hauptmaxima und -minima im CD-Spektrum von Chl-AtWSCPhis stimmt einigermaßen mit den entsprechenden Signalen bei Chl-BoWSCPhis überein (vgl. 4.1.2.2). Die Verschiebung des Rotminimums zu kürzeren Wellenlängen nach 659 nm und das zusätzliche Minimum bei 466 nm weisen wieder auf einen erhöhten Chl-*b*-Anteil hin, wie es auch bei den entsprechenden Spektren von stark Chl-*b*-haltigem Chl-BoWSCPhis zu beobachten war (s. Abb. 4-8). Bei Chlid-AtWSCPhis, welches wie soeben erwähnt (fast) ausschließlich Chlid *b* gebunden hat, sind alle Hauptmaxima und -minima zu längeren Wellenlängen verschoben, verglichen mit rein Chl-*b*-haltigem BoWSCPhis, wo die Hauptminima bei 464 und 655 nm und das Hauptmaximum bei 667 nm liegen.

4.1.10.2 Stabilität von AtWSCPhis

4.1.10.2.1 Hitzestabilität von Chl-, Chlid, und Pheo-AtWSCPhis

Blumenkohl-WSCP ist als Chl-Protein-Komplex äußerst hitzebeständig (s. 4.1.7.1), als Chlidhaltiges Protein jedoch nicht. Da festgestellt wurde, dass *Arabidopsis*-WSCP diese Pigmente ebenfalls binden kann (s. 4.1.10.1) sollte untersucht werden, ob sich dieses WSCP genauso verhält. Außerdem wurde der AtWSCPhis-Komplex, der Pheophytin bzw. ein unbekanntes Pigment-Derivat enthielt, diesbezüglich untersucht.



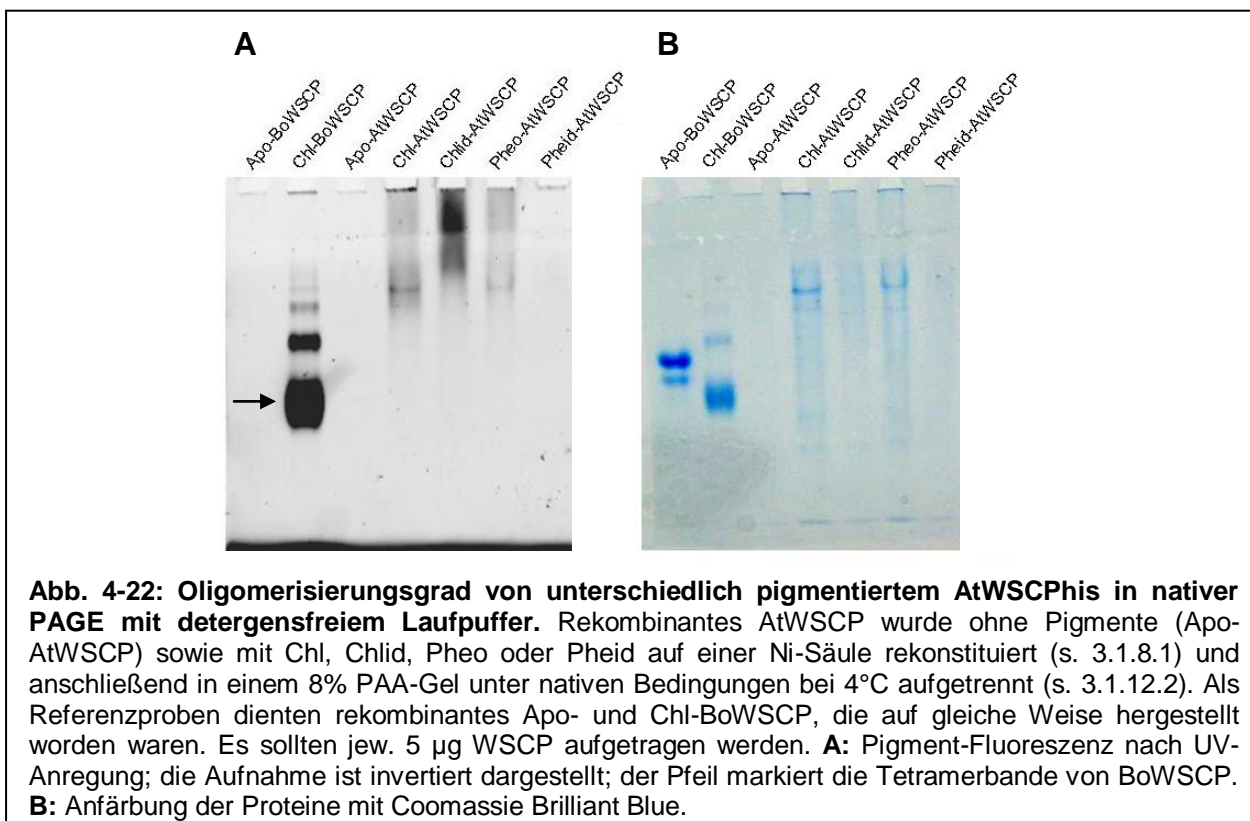
In Abb. 4-21 A und B kann man sehen, dass sich das mit Chl bzw. Chlid pigmentierte Protein vergleichbar zu den entsprechenden BoWSCPhis-Komplexen verhält – Chl-AtWSCPhis ist hitzestabil, während Chlid-AtWSCPhis bei Hitzebehandlung denaturiert. Das Chl-haltige Protein (Abb. 4-21 A) zeigt aber im Vergleich zu BoWSCPhis nach der Hitzebehandlung einen leichten Rückgang des CD-Signals (rote Kurve) und scheint somit möglicherweise ein wenig instabiler. Es ist jedoch schwierig, die beiden Proben direkt zu vergleichen, da die BoWSCPhis-Probe 60 Min. bei 95°C behandelt wurde, die AtWSCPhis-Probe nur 15 Min., dafür aber bei 100°C behandelt wurde. Bei Chlid-AtWSCPhis sieht man deutlich, dass das CD-Signal nach der 15-minütigen Hitzebehandlung bis auf das schwache intrinsische Signal der freien Pigmente vollständig verschwunden ist. Somit sind diese Komplexe genauso wenig hitzebeständig wie die Chlid-BoWSCPhis-Komplexe.

Interessanterweise zeigen die Pheo-AtWSCPhis-Komplexe eine vergleichbare Stabilität zu den Chl-AtWSCPhis-Komplexen. Das CD-Signal ist selbst nach 15 Min. bei 100°C kaum verändert (Abb. 4-21 C, rote Kurve).

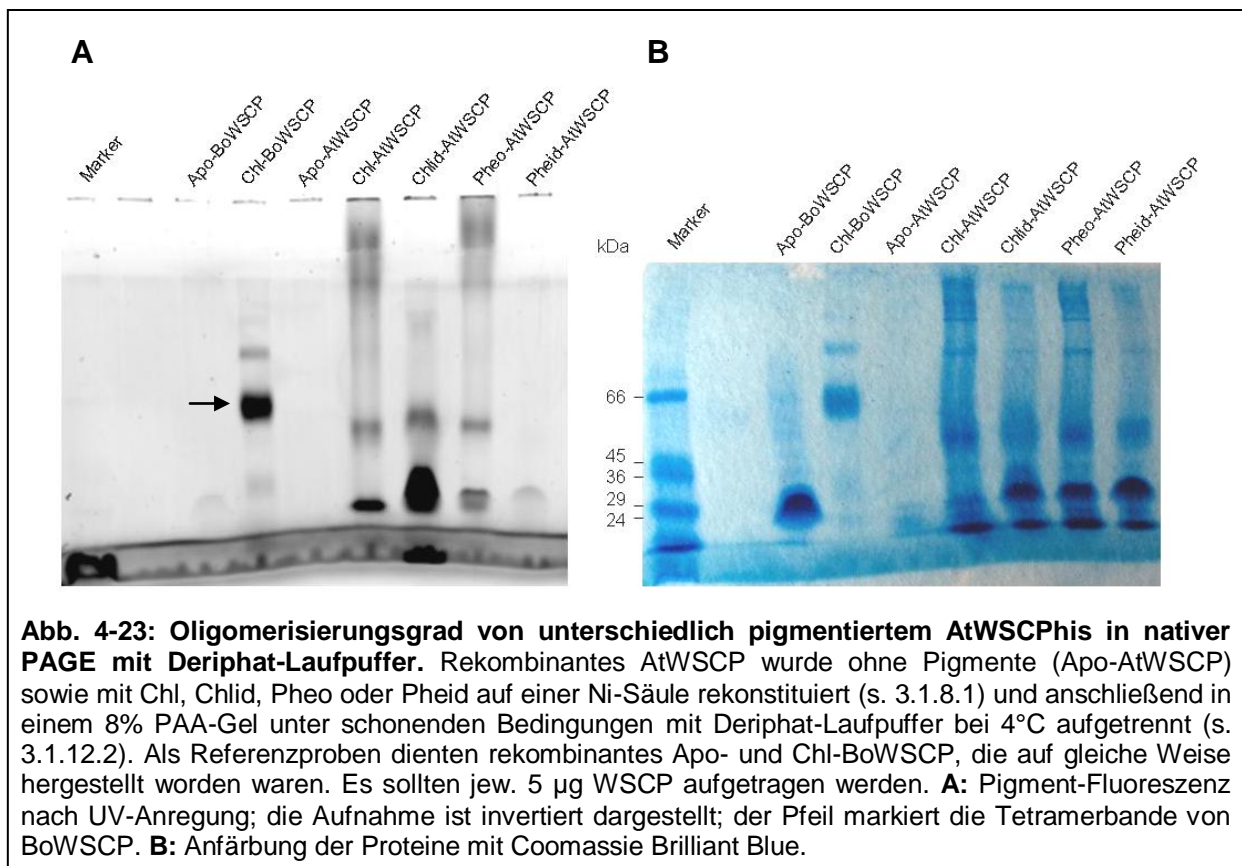
4.1.10.2.2 Oligomerisierungsgrad von Chl-, Chlid, Pheo- und Apo-AtWSCPhis in nativer PAGE

Über *Arabidopsis*-WSCP findet man bislang in der Literatur keine Angaben zum Oligomerisierungszustand des Holoproteins. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit vergleichend zu Blumenkohl-WSCP untersucht, ob es sich bei den AtWSCPhis-Komplexen ebenfalls um Tetramere (und höhere Oligomere) handeln könnte. Gleichzeitig wurde die Stabilität der Komplexe in nativer PAGE bei unterschiedlich stringenten Elektrophoresebedingungen überprüft.

Unter sehr schonenden Bedingungen, d.h. bei detergensfreier nativer PAGE, zeigen die AtWSCPhis-Komplexe fast keine Mobilität im Gel und bleiben in ihrer Laufstrecke weit hinter den BoWSCPhis-Komplexen zurück (Abb. 4-22). Bei Apo- und Pheid-AtWSCPhis ist leider auf keiner der beiden Aufnahmen eine Bande zu sehen, so dass man davon ausgehen muss, dass beim Errechnen der Proteinkonzentration dieser Proben oder beim Beladen des Gels ein Fehler gemacht wurde. Betrachtet man die Pigmentfluoreszenz (A) dann wird deutlich, dass sich die pigmentierten Proteinkomplexe nur knapp unterhalb der Sammelgel/Trenngel-Grenze befinden, etwa gleichauf mit der höchsten sichtbaren Oligomerbande des Chl-BoWSCPhis. Beim Chlid-AtWSCPhis ist gar keine deutlich abgegrenzte Bande zu sehen, sondern nur ein starkes Fluoreszenzsignal im Sammelgel und darunter ein diffuses Signal. Weiter unten im Gel ist bei keiner der AtWSCPhis-Proben Fluoreszenz zu sehen – auf dem Coomassie-gefärbten Gel (B) sind jedoch noch zwei weitere schwache Proteinbanden sichtbar, die eine etwas höhere Mobilität als die unterste Proteinbande des Chl-BoWSCPhis besitzen. Unter diesen schonenden Bedingungen scheint demnach pigmentiertes rekombinantes *Arabidopsis*-WSCP nur in höher oligomerer Form, möglicherweise als unspezifische Aggregate, vorzuliegen.



Erhöht man die Stringenz bei den Elektrophoresebedingungen durch Verwendung des zwitterionischen Detergens Deriphat, zeigen die AtWSCP-Phis-Komplexe eine dem BoWSCP-Phis vergleichbare PAGE-Mobilität (Abb. 4-23). Es sind bei Chl-, Chlid- und Pheo-AtWSCP zwei deutliche Pigmentfluoreszenzbanden im Trenngel zu erkennen (A) – die obere läuft etwas weiter im Gel als die Tetramerbande von Chl-BoWSCP (Pfeil), die untere liegt etwa auf gleicher Höhe wie die Monomerbande des Apo-BoWSCP, wie man beim Vergleich mit der Proteinanfärbung in Abb. 4-23 B sehen kann. Bei Apo-AtWSCP ist leider auf dem Coomassie-gefärbten Gel wieder keine deutliche Bande zu sehen – man kann nur eine schwache Bande ca. auf Höhe der Apo-BoWSCP Monomere erahnen, jedoch kann die mit Pheid-AtWSCP bezeichnete Probe auch als Apo-AtWSCP betrachtet werden, da das Pigment in diesem Fall nicht (oder kaum) vom Protein gebunden wurde (vgl. 4.1.10.1).



Bei Chlid-AtWSCP ist noch zu erkennen, dass der Pigment-Protein-Komplex einen Teil seiner Pigmente während der Elektrophorese verloren hat, so wie es auch beim Chlid-BoWSCP der Fall gewesen ist (vgl. Abb. 4-16 A). Anders als bei BoWSCP ist bei den pigmentierten AtWSCP-Komplexen jedoch die starke Ausprägung der unteren Fluoreszenzbande. Während bei BoWSCP lediglich eine sehr schwache Fluoreszenz unterhalb der stark ausgeprägten Tetramerbande zu sehen ist, ist dies beim AtWSCP fast genau der umgekehrte Fall, zumindest bei der Chl- und der Chlid-Probe.

4.2 Versuche zur biologischen Funktion von WSCP

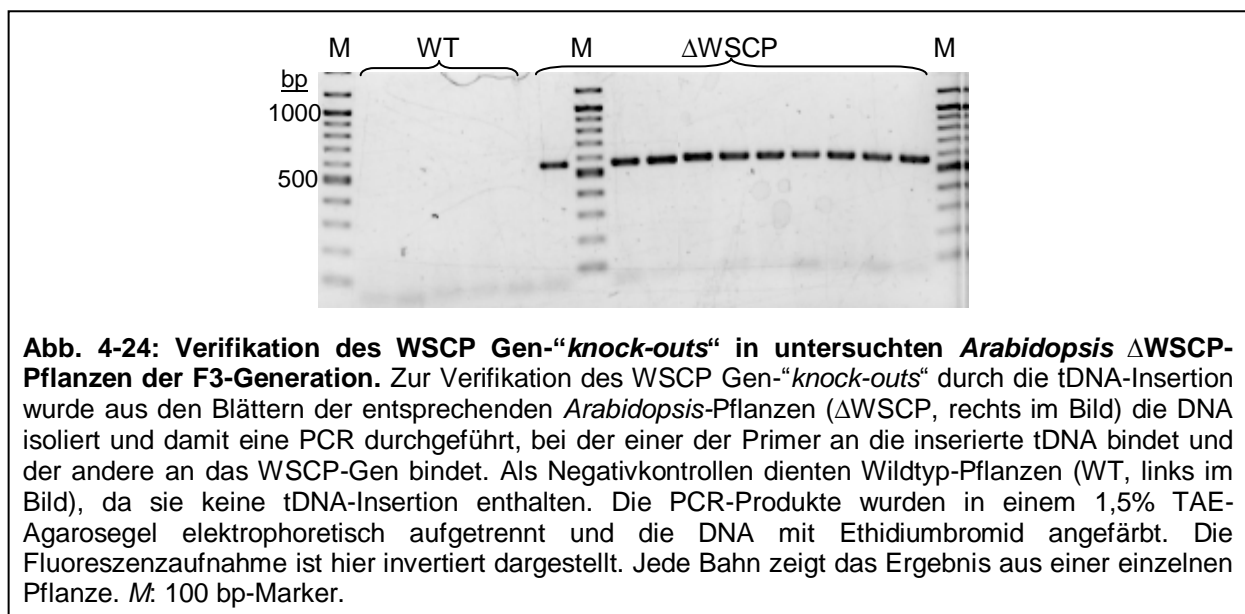
Um der Frage nach der möglichen biologischen Funktion des WSCP nachzugehen, wurden einerseits vergleichende physiologische Versuche mit *Arabidopsis* WSCP-*knock-out*- und Wildtyp-Pflanzen und andererseits verschiedene Assays mit rekombinantem Blumenkohl-WSCP durchgeführt. Sie sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

4.2.1 Genetische Charakterisierung der WSCP-*knock-out*-Mutante

Bevor die physiologischen Versuche mit WSCP-*knock-out*-Pflanzen (Δ WSCP-Pflanzen) durchgeführt werden konnten, mussten diese auf genetischer Ebene näher charakterisiert werden. Dabei war der erste Schritt die Verifikation des Gen-*knock-outs*. Des Weiteren sollte die genaue Lokalisation des Gen-*knock-outs* bestimmt und festgestellt werden, ob die Pflanzen homo- oder heterozygot bezüglich dieses Merkmals sind.

4.2.1.1 Verifikation der tDNA-Insertion

Um die Inaktivierung des WSCP-Gens durch die tDNA-Insertion zu bestätigen, wurde aus den *Arabidopsis*-Pflanzen DNA isoliert und damit eine PCR durchgeführt, bei der einer der Primer an die tDNA und der andere an das WSCP-Gen bindet. Falls die Pflanzen das tDNA-Insert im WSCP-Gen besitzen, wäre demnach ein PCR-Produkt zu erwarten. Als Negativkontrolle dienen Wildtyp (WT)-Pflanzen vom gleichen Ecotyp wie die *knock-out*-Mutanten (Columbia 0), bei denen der eine Primer aufgrund der fehlenden tDNA-Sequenz nicht binden kann.

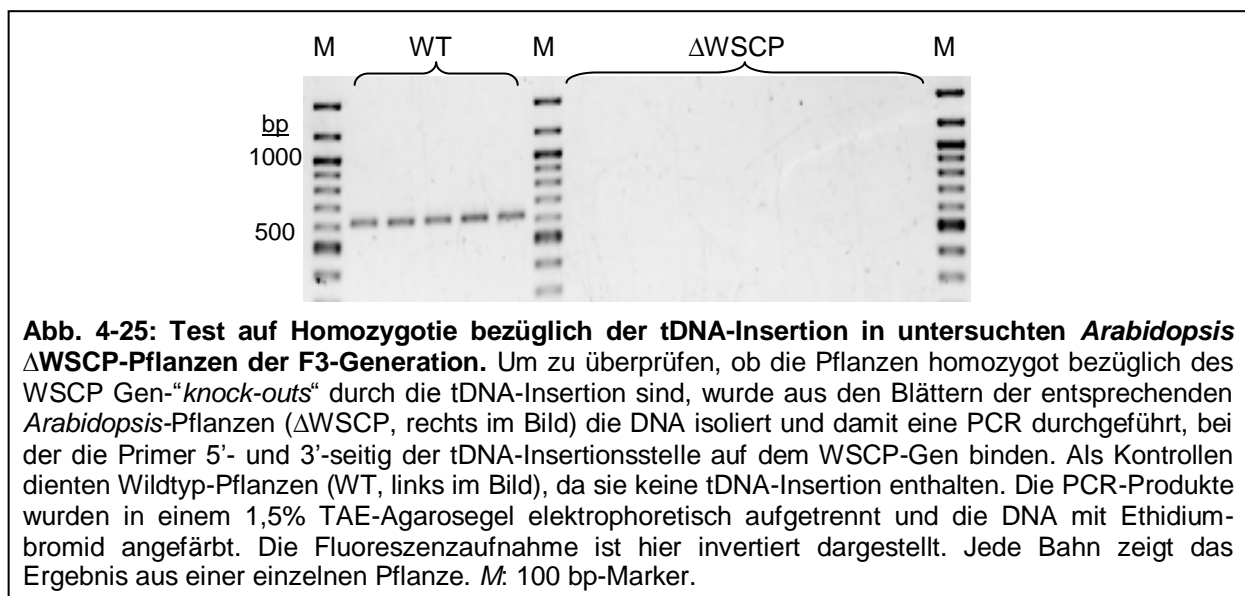


In Abb. 4-24 ist das Ergebnis einer solchen PCR am Beispiel von Δ WSCP-Pflanzen der F3-Generation dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei den WT-Pflanzen wie erwartet kein PCR-Produkt entstanden ist; unterhalb der 100 bp-Markerbande sind lediglich die schwachen Fluoreszenzsignale der Primer zu sehen. Dagegen tritt bei allen Δ WSCP-

Pflanzen ein PCR-Produkt mit einer Größe von ca. 560 bp auf. Alle untersuchten Mutanten enthielten somit das tDNA-Insert im WSCP-Gen.

4.2.1.2 Homozygotietest

Nachdem wie in 4.2.1.1 beschrieben verifiziert wurde, dass die untersuchten Δ WSCP-Pflanzen tatsächlich das Gen-*“knock-out“* haben sollte überprüft werden, ob es sich dabei um einen homozygoten oder einen heterozygoten Gen-*“knock-out“* handelt. Dazu wurde wieder mit der aus den Pflanzen extrahierten DNA eine PCR durchgeführt, diesmal mit Primern, die 5'- und 3'-seitig der tDNA-Insertionsstelle auf dem WSCP-Gen binden. Unter den gewählten Versuchsbedingungen kann bei homozygoten Δ WSCP-Pflanzen kein PCR-Produkt entstehen, da die tDNA mit > 4000 bp zu groß ist, um amplifiziert zu werden. Sind die Pflanzen jedoch heterozygot fehlt die tDNA-Insertion auf einem Allel und der 621 bp lange Bereich zwischen den beiden Primern kann dort amplifiziert werden. Als Kontrolle wurden WT-Pflanzen verwendet.



Wie man in Abb. 4-25 erkennen kann, kam es nur bei den WT-Positivkontrollen zu einem PCR-Produkt. Bei allen untersuchten Δ WSCP-Pflanzen der F3-Generation handelte es sich demnach um homozygote Pflanzen bezüglich des WSCP-Gen-*“knock-out“*s. Da es sich hierbei um dieselben DNA-Proben handelt, die in Abschnitt 4.2.1.1 beschrieben wurden und dort alle zu einem PCR-Produkt geführt haben, kann ausgeschlossen werden, dass das Fehlen eines PCR-Produkts bei den Δ WSCP-Pflanzen in Abb. 4-25 durch Mängel in der DNA-Qualität bedingt ist.

4.2.1.3 Bestimmung der tDNA-Insertionsstelle

Hierzu wurde eine präparative PCR mit den in 4.2.1.1 beschriebenen Primern durchgeführt, die Probe mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend das PCR-Produkt aus dem Agarosegel extrahiert und aufgereinigt. Mit den beiden Primern wurde es einmal 5'-seitig und einmal 3'-seitig ansequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung zeigte, dass die tDNA in antisense-Richtung direkt nach bp 27.220.072 im *Arabidopsis*-Genom –

und somit im WSCP-Gen (bp 27.219.514 – bp 27.220.161) inseriert ist. Dies stimmt nicht mit den Angaben des NASC, von denen die Δ WSCP-Samen bezogen wurden, überein, da sie bp 27.220.116 als Insertionsstelle angeben. Für die erfolgreiche Inaktivierung des richtigen Zielgens spielt dies aber keine Rolle.

4.2.2 Physiologische Versuche mit WT und Δ WSCP

Wie in den vorigen Abschnitten beschrieben, konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine homozygote F3-Generation von Δ WSCP-Pflanzen erfolgreich herangezogen werden konnte. Somit konnten diese Pflanzen nun vergleichend zu den WT-Pflanzen auf Auffälligkeiten untersucht werden, um mögliche Hinweise auf die biologische Funktion des Proteins zu erhalten. Die Δ WSCP-Pflanzen zeigten nach Anzucht unter optimalen Kulturbedingungen keine sichtbaren phänotypischen Auffälligkeiten, daher wurden sie bezüglich einiger physiologischer Parameter genauer untersucht.

4.2.2.1 Wachstum

Falls WSCP wirklich – wie in einigen Literaturquellen postuliert wird – als Transporter für Chl und seine Vorstufen dient, könnte man erwarten, dass Pflanzen, denen dieses Protein fehlt, langsamer wachsen als WT-Pflanzen, da bei ihnen möglicherweise aufgrund eines verlangsamten Chl-Transports die Assemblierung der Lichtsammelkomplexe behindert ist. Um dies zu überprüfen, wurde das Wachstum von Δ WSCP- und WT-*Arabidopsis*-Pflanzen, die unter identischen Bedingungen gehalten wurden, 40 Tage lang überwacht und dokumentiert. Dabei wurde sichergestellt, dass alle Pflanzen mit gleicher Lichtintensität bestrahlt wurden, da für unser Auge nicht sichtbare leichte Unterschiede in der Lichtintensität eine deutliche Auswirkung auf die Wachstumsgeschwindigkeit haben und somit die Versuchsergebnisse verfälschen würden. Wie man in Abb. 4-26 sieht, gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mutanten und den WT-Pflanzen bezüglich des Wachstums unter Standardanzuchtsbedingungen.

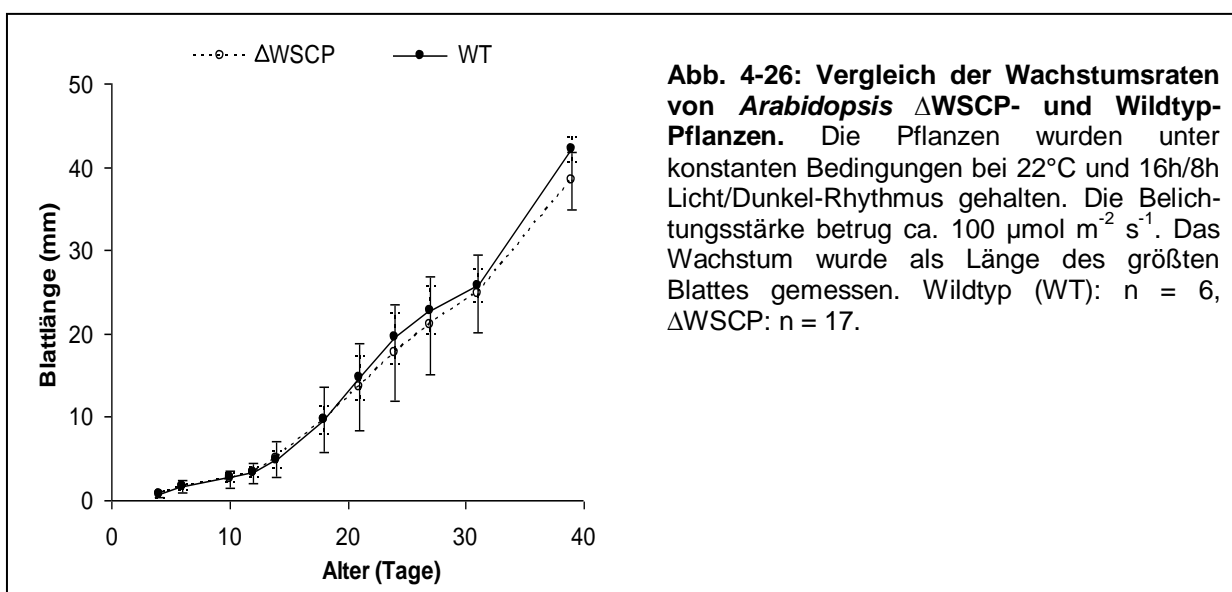


Abb. 4-26: Vergleich der Wachstumsraten von *Arabidopsis* Δ WSCP- und Wildtyp-Pflanzen. Die Pflanzen wurden unter konstanten Bedingungen bei 22°C und 16h/8h Licht/Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Belichtungsstärke betrug ca. $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Das Wachstum wurde als Länge des größten Blattes gemessen. Wildtyp (WT): n = 6, Δ WSCP: n = 17.

4.2.2.2 Ergrünung

Um eingehender die Hypothese zu untersuchen, dass WSCP als Chl-Transporter dient, wurde die Ergrünungsgeschwindigkeit der Δ WSCP-Pflanzen im Vergleich zum WT beobachtet. Es sollte überprüft werden, ob die Mutanten langsamer ergrünen als die WT-Pflanzen.

Dazu wurden die Samen steril auf Agar-haltigem Nährmedium ausgesät und vier Tage lang ohne Licht angezogen, bevor die etiolierten Keimlinge dann belichtet wurden. Nach Beginn der Belichtung wurde in regelmäßigen Abständen die Chl-Fluoreszenz mit einer Kamera, der ein geeigneter Rotfilter vor das Objektiv gesetzt wurde, dokumentiert. Dieser Versuch wurde sowohl unter „normaler“ Lichtintensität von ca. $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durchgeführt, als auch unter Starklichtbedingungen (ca. $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und auf vollwertigem Murashige und Skoog (MS) Nährmedium sowie auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium.

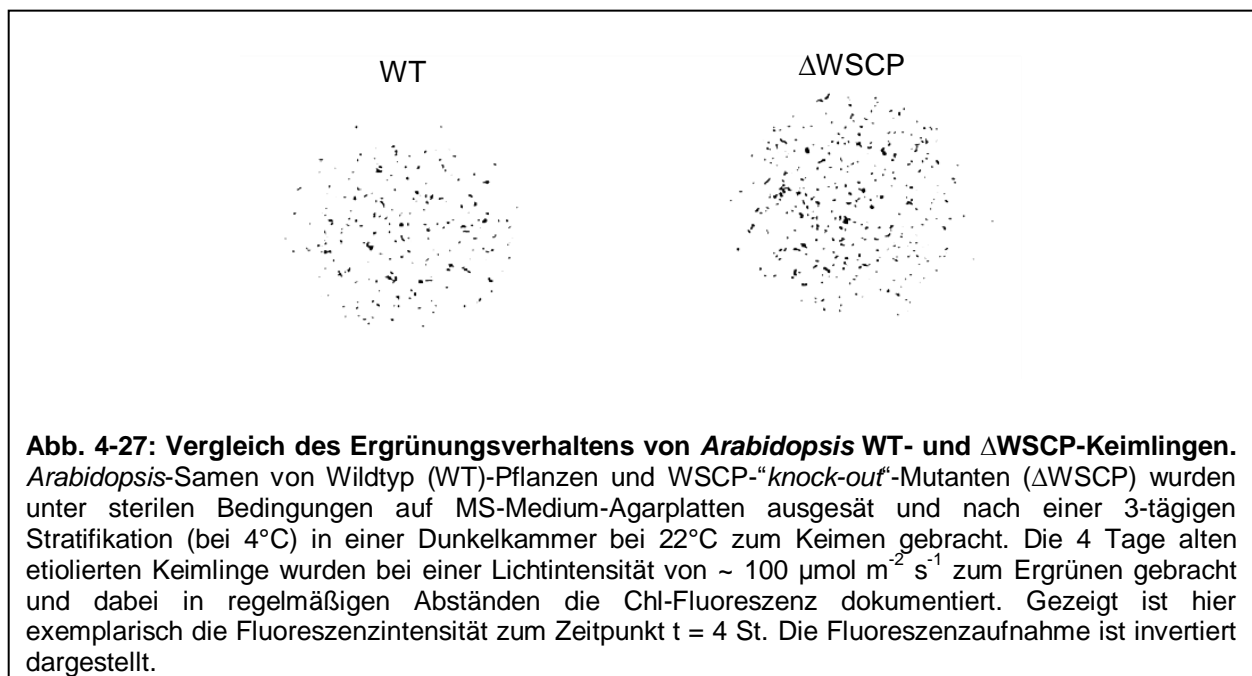


Abb. 4-27: Vergleich des Ergrünungsverhaltens von *Arabidopsis* WT- und Δ WSCP-Keimlingen. *Arabidopsis*-Samen von Wildtyp (WT)-Pflanzen und WSCP-*knock-out*-Mutanten (Δ WSCP) wurden unter sterilen Bedingungen auf MS-Medium-Agarplatten ausgesät und nach einer 3-tägigen Stratifikation (bei 4°C) in einer Dunkelkammer bei 22°C zum Keimen gebracht. Die 4 Tage alten etiolierten Keimlinge wurden bei einer Lichtintensität von $\sim 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zum Ergrünen gebracht und dabei in regelmäßigen Abständen die Chl-Fluoreszenz dokumentiert. Gezeigt ist hier exemplarisch die Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt $t = 4$ St. Die Fluoreszenzaufnahme ist invertiert dargestellt.

In Abb. 4-27 ist eine solche Fluoreszenzaufnahme invertiert dargestellt. Dass insgesamt bei Δ WSCP mehr Fluoreszenzsignale zu beobachten sind liegt daran, dass auf dieser Platte mehr Samen gekeimt sind als beim WT und daher mehr ergrünende Keimlinge vorhanden waren. Man sieht jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Fluoreszenzintensität zwischen den beiden Proben. Bei keinem der durchgeführten Ergrünungsversuche konnte zwischen Δ WSCP- und WT-Pflanzen ein signifikanter Unterschied in der Ergrünungsgeschwindigkeit beobachtet werden.

4.2.2.3 Starklicht-Stress

Falls WSCP beim stressbedingten Abbau von Lichtsammelkomplexen als Chl-Transporter zum ersten Enzym des Chl-Katabolismus dient, könnte man erwarten, dass Starklicht-gestresste Δ WSCP-Pflanzen stärkere Photooxidationsschäden zeigen als WT-Pflanzen, da sich in ihnen freies Chl anhäufen müsste. Dieses könnte seine Anregungsenergie auf

Sauerstoff übertragen und somit zum reaktiven und zellschädigenden $^1\text{O}_2$ führen. Daher wurden Versuche durchgeführt, bei denen ΔWSCP - und WT-Pflanzen verschiedenen Lichtstressbedingungen ausgesetzt wurden und ihr Verhalten diesbezüglich verglichen.

Die Starklicht-Stressversuche wurden einmal mit adulten Pflanzen durchgeführt, die drei Tage lang mit einem Rhythmus aus 11 Stunden Starklicht und 13 Stunden Dunkelheit behandelt wurden (Abb. 4-28), und einmal mit 17 Tage alten Keimlingen (nicht gezeigt), die unter Schwachlichtbedingungen gehalten und vier Tage lang mit 30-minütigen Starklichtphasen behandelt wurden (um eine Anpassung an die Starklichtbedingungen zu vermeiden). Von den Keimlingen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Blattproben entnommen und die darin enthaltenen Pigmente analysiert (s. Abb. 4-29).

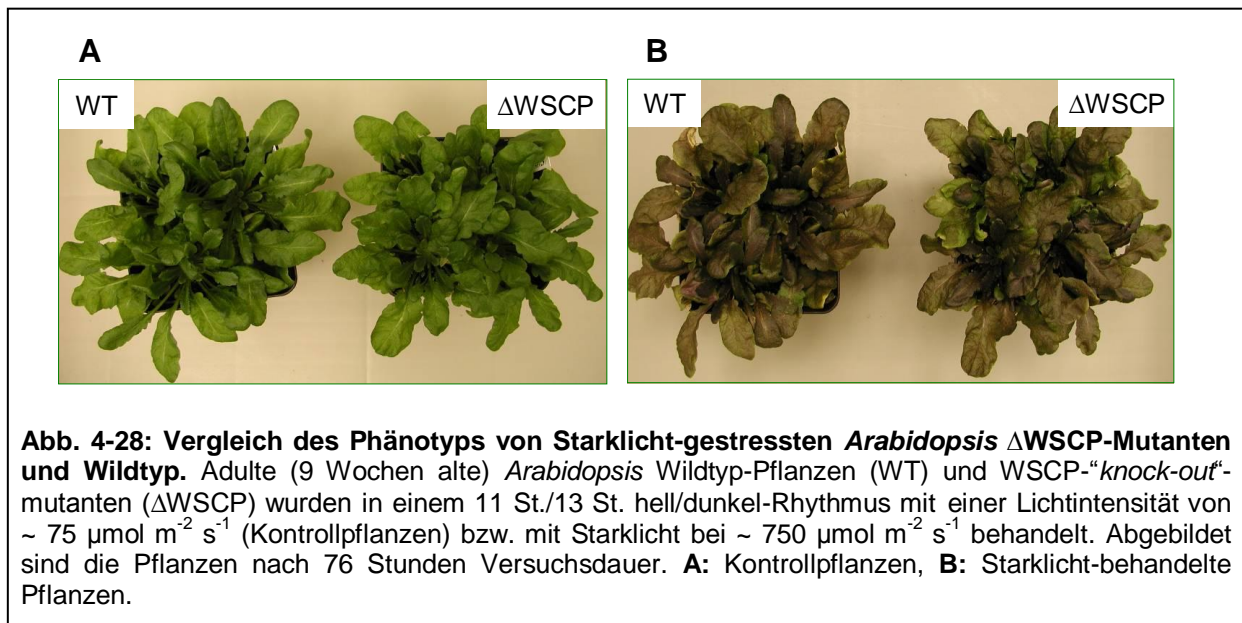
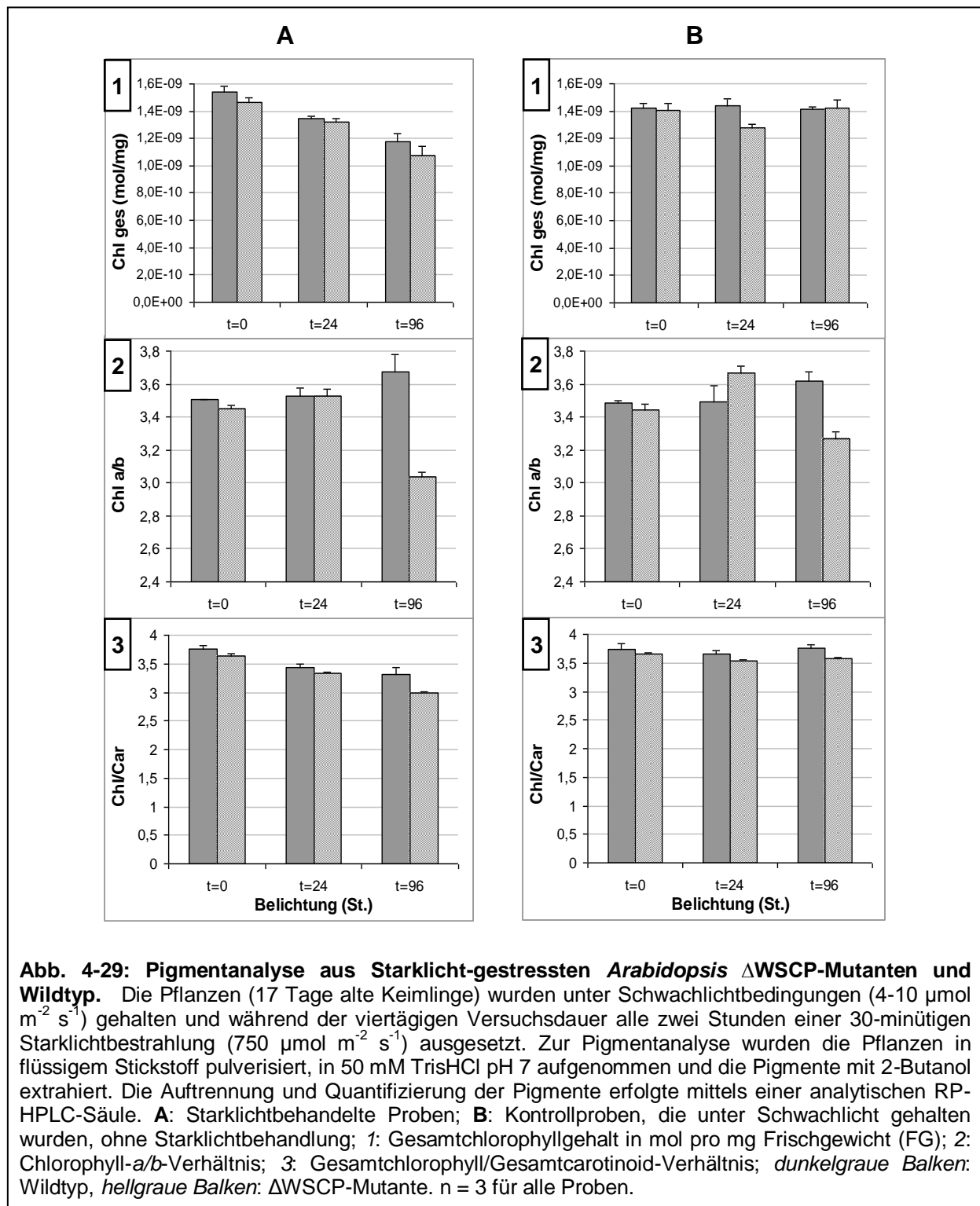


Abb. 4-28: Vergleich des Phänotyps von Starklicht-gestressten *Arabidopsis* ΔWSCP -Mutanten und Wildtyp. Adulte (9 Wochen alte) *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen (WT) und WSCP-*knock-out*-mutanten (ΔWSCP) wurden in einem 11 St./13 St. hell/dunkel-Rhythmus mit einer Lichtintensität von $\sim 75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Kontrollpflanzen) bzw. mit Starklicht bei $\sim 750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ behandelt. Abgebildet sind die Pflanzen nach 76 Stunden Versuchsdauer. **A:** Kontrollpflanzen, **B:** Starklicht-behandelte Pflanzen.

Bei dem Versuch mit den adulten Pflanzen konnten keine phänotypischen Unterschiede zwischen WT- und ΔWSCP -Pflanzen in Bezug auf ihre Starklichtreaktion festgestellt werden. Beide zeigten gleichermaßen eine starke Violettfärbung als Stressantwort, im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (Abb. 4-28).

Daher wurde in dem zweiten Starklichtversuch mit den Keimlingen eine Pigmentanalyse durchgeführt, um nachzuprüfen, ob es wenigstens auf dieser Ebene Unterschiede gibt zwischen *Arabidopsis*-Pflanzen, die WSCP enthalten und welchen, denen dieses Protein fehlt. In Abb. 4-29 sind diese Ergebnisse zusammenfassend dargestellt.



Betrachtet man Spalte A in Abb. 4-29 (die Starklicht-behandelten Proben), so ist nur bei einer einzigen Probe ein signifikanter Unterschied zwischen den WT- und den Δ WSCP-Pflanzen zu erkennen: beim Chl-a/b-Verhältnis der Blätter nach 96 Stunden Versuchsdauer (Diagramm 2). Hier liegt das Chl-a/b-Verhältnis beim WT bei etwas über 3,6, bei Δ WSCP jedoch deutlich niedriger bei knapp über 3,0. Allerdings ist zu beachten, dass auch bei den Kontrollpflanzen (Spalte B, Diagramm 2) gerade bei dieser Probe der größte Unterschied

zwischen den WT- und Δ WSCP-Pflanzen gemessen wurde. Ob es sich hierbei möglicherweise um einen Phänotyp der Mutante handelt wird in 5.2.1 näher erörtert.

Bei allen anderen Proben ist kein signifikanter Unterschied zwischen den WT- und Δ WSCP-Pflanzen feststellbar. Die Gesamtchlorophyllmenge nimmt im Vergleich zu den Kontrollpflanzen bei beiden im Laufe des Versuchs gleichmäßig ab (Diagramm 1), genau wie das Gesamtchlorophyll/Gesamtcarotinoid-Verhältnis (Diagramm 3), und das Chl-*a/b*-Verhältnis bleibt – bis auf die bereits erwähnte Probe nach 96 Stunden Versuchsdauer – bei beiden Pflanzengruppen relativ konstant.

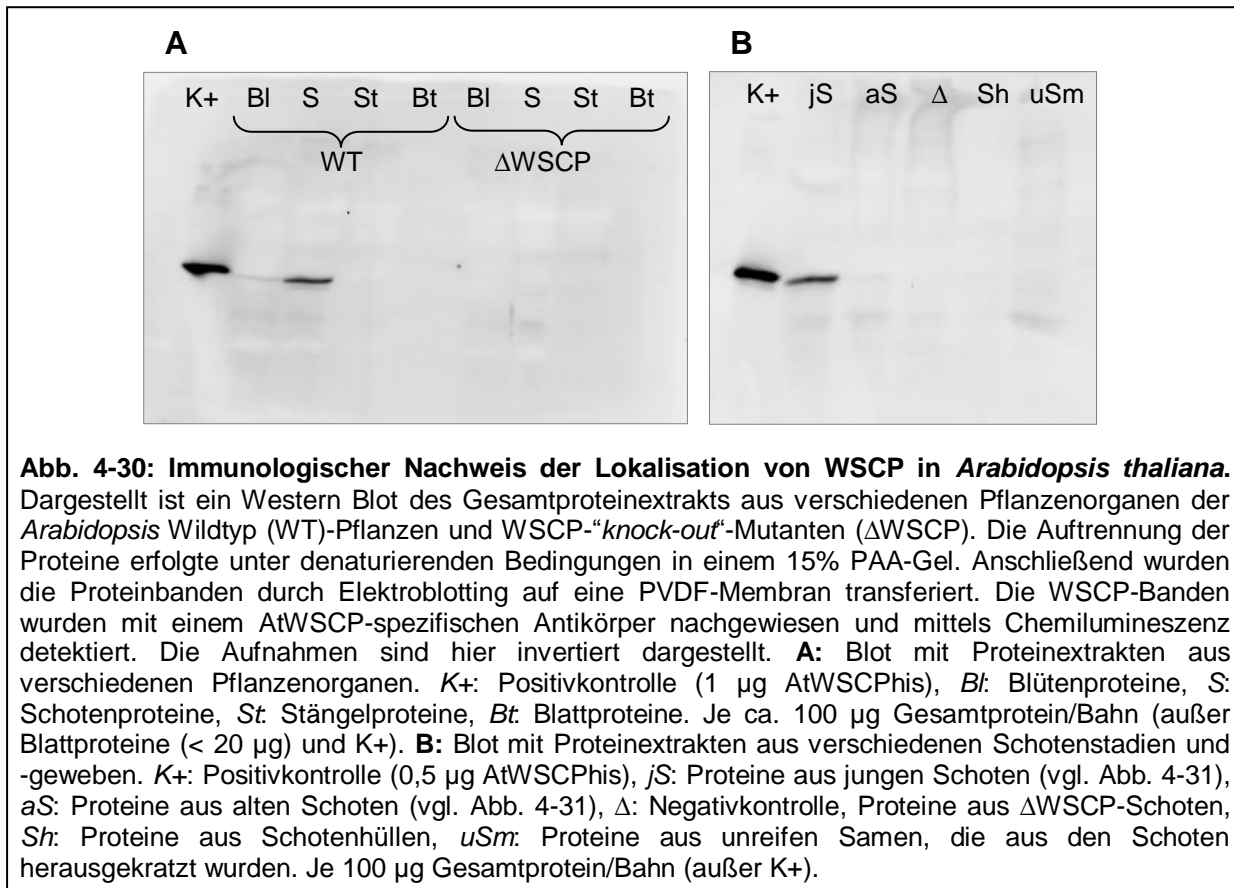
4.2.3 Natives WSCP aus *Arabidopsis thaliana*

Da bei den durchgeführten physiologischen Versuchen keine signifikanten Unterschiede zwischen den vegetativen Stadien der *Arabidopsis* WT- und Δ WSCP-Pflanzen festzustellen waren (vgl. 4.2.2) stellte sich die Frage, ob in *Arabidopsis* das WSCP wie die anderen beschriebenen *Brassicaceae*-WSCPs in den Blättern lokalisiert ist. Inzwischen konnte unter Anleitung der Autorin im Rahmen der Diplomarbeit von Andrea Weil (2007) das *Arabidopsis*-WSCP ausreichend aufgereinigt werden, um einen Antikörper gegen das Protein herstellen zu lassen. Somit konnte auf Proteinebene nach WSCP in verschiedenen Pflanzenorganen von *Arabidopsis* gesucht werden.

4.2.3.1 Lokalisation von AtWSCP mittels Western Blot

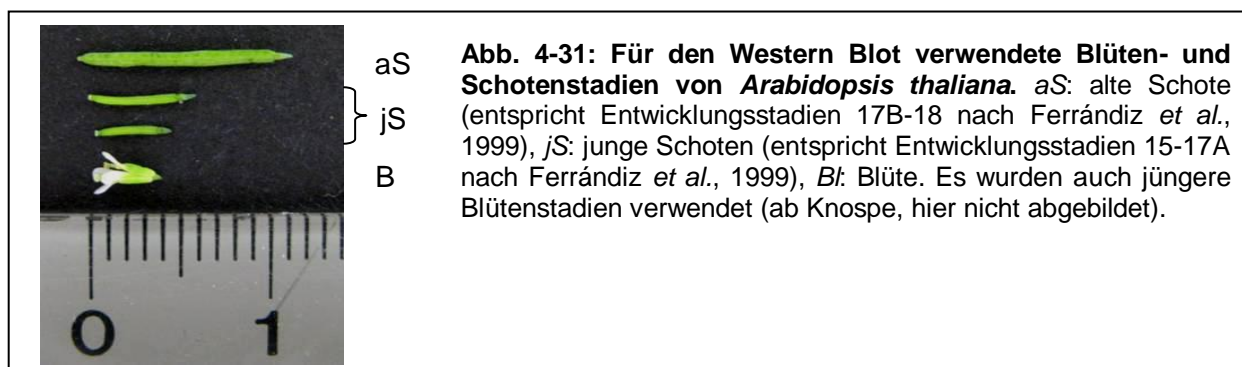
Um WSCP in *Arabidopsis* zu lokalisieren, wurde aus verschiedenen Pflanzenorganen der WT-Pflanzen (und zur Negativkontrolle aus Δ WSCP-Pflanzen) ein Gesamtproteinextrakt hergestellt, der mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurde und anschließend mittels Western Blot immunologisch auf die Anwesenheit von WSCP untersucht wurde. Als Positivkontrolle diente dabei das aufgereinigte rekombinante Protein (AtWSCP_{His}).

In Abb. 4-30 A sieht man, dass von den untersuchten Pflanzenorganen lediglich die Schoten ein starkes Signal auf dem Blot zeigen. Das Signal befindet sich auch auf der erwarteten Höhe auf der Membran – natives *Arabidopsis*-WSCP hat ein Molekulargewicht von ca. 20,6 kDa und das Signal befindet sich etwas unterhalb des Signals der Positivkontrolle, deren Molekulargewicht ca. 21,8 kDa beträgt. Bei den Blüten ist ein sehr schwaches Signal zu sehen, allerdings konnten die späten Blütenstadien nicht vollständig von den jungen Schotenstadien getrennt werden, daher ist nicht auszuschließen, dass die Blütenprobe auch einige junge Schoten enthielt. Dass bei den Blattproteinen kein Signal zu sehen ist, ist bei dem in Abb. 4-30 A abgebildeten Blot nicht aussagekräftig, da in dieser Probe deutlich weniger Gesamtprotein aufgetragen wurde (< 20 μ g; bei allen anderen Proben ca. 100 μ g). Dieser Blot wurde jedoch mit Proteinextrakten aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien von Blättern wiederholt, mit 50 μ g Gesamtprotein pro Probe, und auch da konnte kein WSCP nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Bei den Negativkontrollen (Δ WSCP) ist erwartungsgemäß bei keiner der Proben ein Signal zu sehen.



Nachdem bezüglich der Pflanzenorgane die Frage nach der Lokalisation des *Arabidopsis*-WSCPs geklärt war, wurde untersucht, ob das Protein in allen Entwicklungsstadien der Schoten vorkommt. Zudem wurde versucht festzustellen, ob innerhalb der Schote eine gewebespezifische Verteilung des Proteins vorliegt und daher das Gewebe der Schotenhülle und das der unreifen Samenanlagen im Schoteninneren immunologisch auf das Vorhandensein von WSCP untersucht.

In Abb. 4-30 B sieht man deutlich, dass WSCP bei *Arabidopsis* fast ausschließlich in den frühen Schotenentwicklungsstadien und damit in jungen Schoten vorkommt. Eine mit Hilfe der VersaDoc durchgeführte densitometrische Auswertung der Signalintensität ergab, dass das native WSCP in den jungen Schoten ca. 1/1000 des Gesamtproteins ausmacht. Bei den älteren Entwicklungsstadien ist nur ein sehr schwaches Signal auf dem Blot zu erkennen. Die für den Western Blot verwendeten Schotenstadien sind in Abb. 4-31 dargestellt.

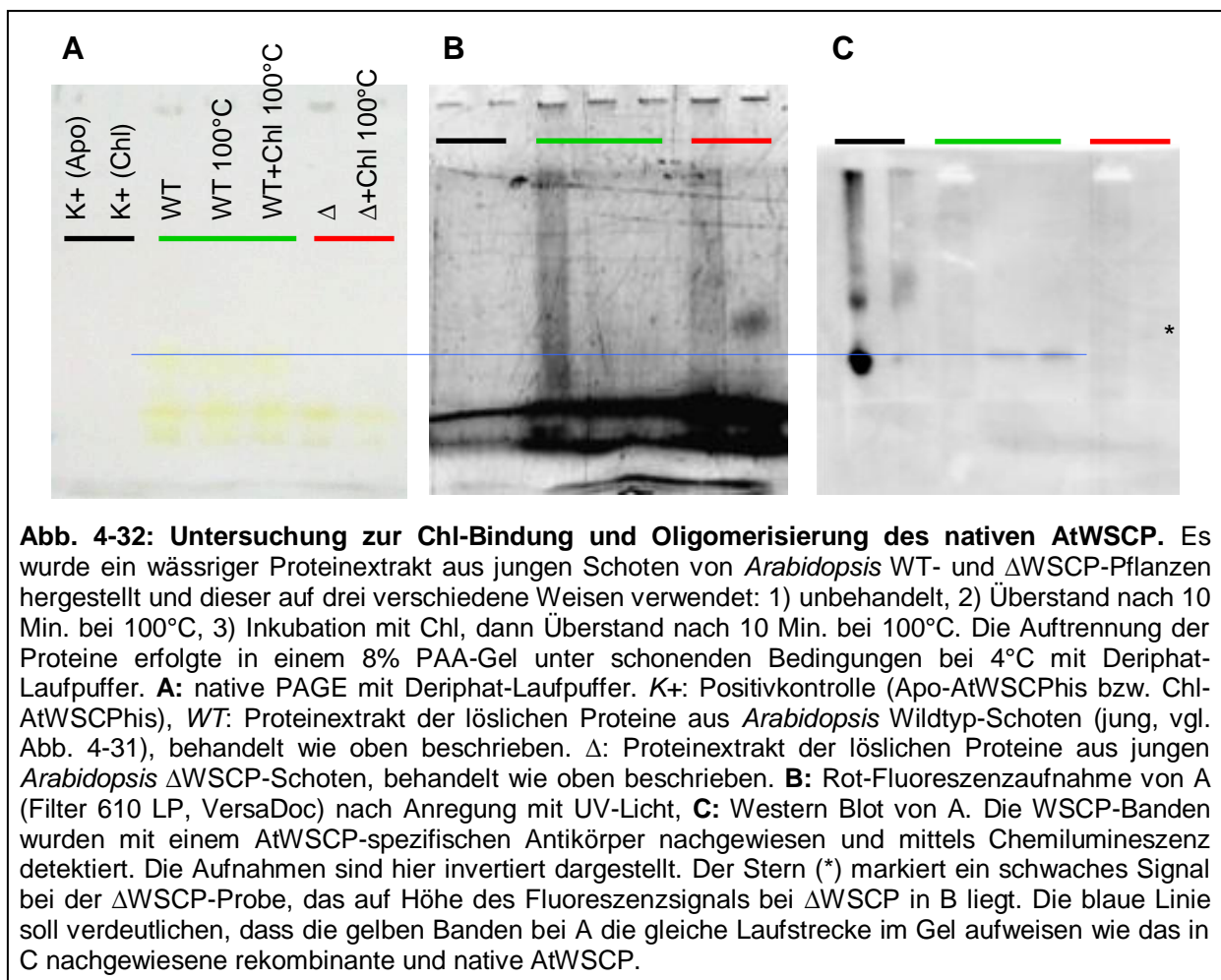


Da in den älteren Schoten kaum WSCP nachweisbar war und es nur bei diesen möglich war, die Schotenhülle von den unreifen Samen zu trennen, konnte die Frage nach der gewebespezifischen Lokalisation des *Arabidopsis*-WSCPs in den Schoten nicht beantwortet werden. Auf dem in Abb. 4-30 B dargestellten Blot kann man zwar bei genauerem Hinsehen ein schwaches Signal auf der richtigen Höhe bei den Schotenhüllen-Proteinen erkennen, allerdings ist nicht auszuschließen, dass ebenfalls ein schwaches WSCP-Signal in der Proteinprobe aus dem unreifen Samengewebe vorhanden ist, welches jedoch im Hintergrundsignal untergeht.

Neben den hier gezeigten Western Blots wurden noch weitere Gewebe und Organe von *Arabidopsis*-Pflanzen immunologisch auf WSCP-Gehalt untersucht, darunter verschiedene Blattstadien (jung, adult, seneszent), Keimlinge sowie reife Samen. In keinen dieser Proben wurde WSCP gefunden.

4.2.3.2 Verhalten von AtWSCP in nativer PAGE

Da das native WSCP aus *Arabidopsis thaliana* eindeutig in den jungen Schotenstadien der Pflanzen lokalisiert werden konnte (s. 4.2.3.1), konnte es nun näher untersucht werden. Besonders interessant war die Frage, ob es – wie das native und rekombinante BoWSCP und das rekombinante AtWSCP – Chl binden kann und ebenfalls hitzestabil ist; auch sein Oligomerisierungszustand in nativer PAGE war von Interesse.



In Abb. 4-32 A sieht man ein Foto von der nativen PAGE, die mit den Schotenextrakten in einem 8% PAA-Gel unter Verwendung von Deriphlat-Laufpuffer durchgeführt wurde. Bei allen Schotenextrakten (WT und Δ WSCP) ist in der Lauffront gelbes freies Pigment – vermutlich Carotinoide - vorhanden. Bei den drei unterschiedlich behandelten WT-Proben ist zusätzlich eine gelbe Bande oberhalb der Lauffront zu sehen, die bei den Δ WSCP-Proben fehlt. Es sollte an dieser Stelle jedoch vermerkt werden, dass sich diese Beobachtung nicht reproduzieren ließ – bei Wiederholung des Versuchs mit neuen Proben war diese zusätzliche Bande auch bei den Δ WSCP-Pflanzen zu sehen. Man sieht jedoch in Abb. 4-32 C, dass sich diese gelben Banden auf derselben Höhe im Gel befinden wie das im Western Blot nachgewiesene WSCP (verdeutlicht durch die blaue Linie). Lediglich die erste, unbehandelte, WT-Probe zeigt im Blot kein Signal, was jedoch erfahrungsgemäß durch die Verunreinigung durch sekundäre Pflanzenstoffe bedingt ist.

Es ist anhand der blauen Linie außerdem in Abb. 4-32 C zu erkennen, dass sich das native WSCP (WT-Proben 2 und 3) in seiner PAGE-Mobilität so verhält wie der Hauptanteil des rekombinanten Apoproteins und sich somit knapp oberhalb der Lauffront befindet, während das Chl-haltige rekombinante AtWSCP sich weiter oben im Gel aufhält und somit anscheinend eine höher oligomere Form annimmt. Das rekombinante Apo- und Chl-AtWSCP hat sich hier demnach wie bereits in Abb. 4-23 beobachtet verhalten. Da sich das native Protein trotz Chl-Zugabe wie das Apo-AtWSCP verhält, ist anzunehmen, dass es unter diesen Umständen kein Chl bindet. Es scheint jedoch trotzdem einer Hitzebehandlung standzuhalten, da es in Abb. 4-32 C in den beiden bei 100°C behandelten Proben noch im löslichen Überstand nachweisbar ist.

In Abb. 4-32 B ist die Pigmentfluoreszenz nach UV-Anregung von dem in A abgebildeten Gel dargestellt. Leider wurde bei dem rekombinanten Chl-AtWSCP nicht die angenommene Menge Protein aufgetragen, daher sieht man auch bei dieser als Positivkontrolle gedachten Probe keine Chl-Fluoreszenz. Beim nativen AtWSCP sieht man in den beiden hitzebehandelten Proben keine Chl-Fluoreszenz, was zu der Beobachtung in Abb. 4-32 C passt, dass sich das native AtWSCP wie das rekombinante Apoprotein verhält (s.o.). Auch das gelbe Pigment, das in Abb. 4-32 A zu sehen ist und sich auf selber Höhe wie das native AtWSCP befindet, fluoresziert nicht unter diesen Bedingungen. In den beiden Proben aus dem unbehandelten Schotenextrakt von WT- und Δ WSCP-Pflanzen sieht man jeweils in der gesamten Bahn des Gels eine gleichmäßige Hintergrund-Fluoreszenz, die es unmöglich macht festzustellen, ob vielleicht bei der WT-Probe eine zusätzliche, durch Chl-haltiges WSCP bedingte Fluoreszenz auftritt. Interessanterweise tritt bei der mit Chl und Hitze behandelten Δ WSCP-Probe eine deutlich fluoreszierende Bande auf, die sich in ihrer PAGE-Mobilität ziemlich genau zwischen dem nativen AtWSCP bzw. dem Apo-AtWSCP und dem Chl-AtWSCP bewegt. Auch auf dem Blot (C) ist an dieser Stelle ein sehr schwaches Signal vorhanden (mit einem * gekennzeichnet). Bei allen WT-Proben fehlt diese Bande in der Fluoreszenzaufnahme.

4.2.4 *In vitro* Versuche mit rekombinantem BoWSCP

Die Tatsache, dass bei *Arabidopsis thaliana* das WSCP nicht wie erwartet in den Blättern, sondern nur in den jungen Schoten vorkommt (s. 4.2.3.1) dürfte eine Erklärung dafür sein, dass bei den Untersuchungen zu Wachstum und Ergrünung keine Unterschiede zwischen

WT und Δ -WSCP-Mutante gefunden wurden. Um der Frage nach der biologischen Funktion des WSCP weiter nachzugehen, wurden demnach noch Versuche mit rekombinantem Blumenkohl-WSCP durchgeführt. Das rekombinante *Arabidopsis*-WSCP konnte leider bis zum Ende dieser Arbeit für diese Art von Versuchen nicht in ausreichender Menge exprimiert und rekonstituiert werden, so dass es aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich war, diese Experimente auch mit AtWSCP_{His} durchzuführen.

4.2.4.1 Wechselwirkung mit LHCIIb

In der Literatur ist beschrieben, dass WSCP *in vitro* Chlorophylle aus Thylakoiden entfernen kann (Sato *et al.*, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurde demnach untersucht, ob LHCII als potentieller Interaktionspartner für WSCP in Frage käme. Dazu wurde nativer LHCII mit BoWSCP_{His}-Apoprotein, welches an einer Ni-Säule immobilisiert vorlag, inkubiert, die beiden Proteine durch Herauswaschen des LHCs anschließend wieder voneinander getrennt und dann der LHC mittels HPLC-Analyse auf seine Pigmentzusammensetzung untersucht. Es wurden auch die spektroskopischen Eigenschaften der LHCII-Komplexe vor und nach Inkubation mit WSCP untersucht.

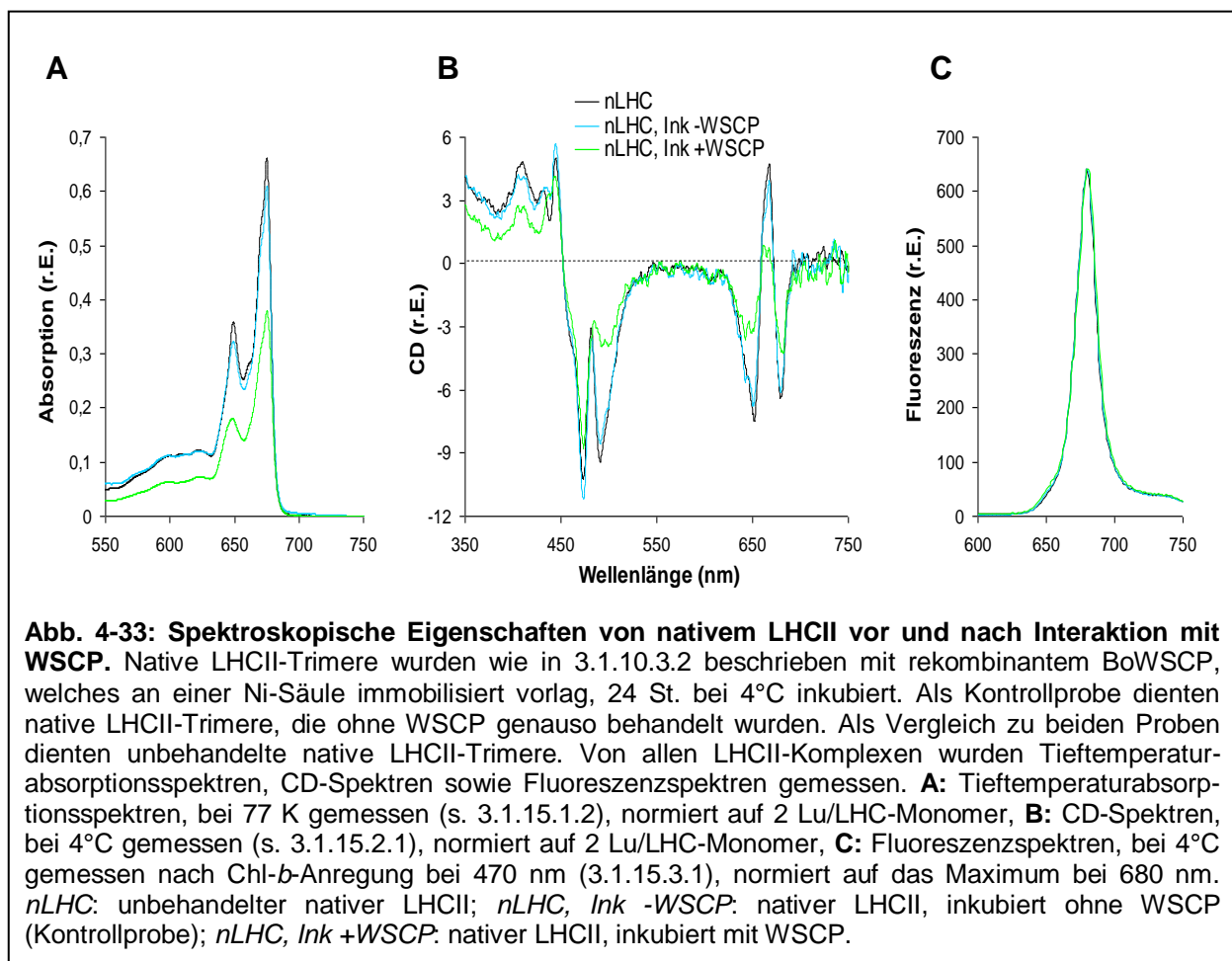
In Tab. 4-8 sieht man die Ergebnisse der Pigmentanalyse. Die Kontrollprobe, die – ohne WSCP – genauso behandelt wurde wie die entsprechend mit WSCP inkubierte Probe, zeigt bis auf den Verlust eines Chl-*a*-Moleküls eine identische Pigmentausrüstung zu gänzlich unbehandeltem nativem LHCII. Anders sieht es bei der LHC-Probe aus, die *mit* WSCP inkubiert wurde – ihr fehlen zwei Chl-*b*- und im Schnitt etwa 2,5 Chl-*a*-Moleküle beim Vergleich mit der Kontrollprobe, und sogar 3,5 Chl *a* im Vergleich zur unbehandelten LHC-Probe. Somit ist der Gesamtchlorophyllgehalt von knapp 13 (Kontrolle) bzw. knapp 14 (unbehandelte Probe) auf ca. 8 gefallen. Die fehlenden Chlorophylle befanden sich im WSCP-Komplex.

Tab. 4-8: Pigmentausrüstung von nativem LHCII vor und nach Inkubation mit WSCP. Native LHCII-Komplexe wurden wie in 3.1.10.3 beschrieben mit BoWSCP_{His} auf einer Ni-Säule inkubiert und anschließend LHCII und WSCP wieder voneinander getrennt; als Kontrolle diente LHCII, der ohne WSCP auf einer Ni-Säule inkubiert wurde. Aus den LHCII-Komplexen wurden vor und nach der Inkubation die Pigmente mittels quantitativer Butanolextraktion (s. Trostmann, 2004, Diplomarbeit) extrahiert und per HPLC analysiert. Die angegebenen Werte sind auf 2 Luteine/LHCII-Monomer normiert. *Ink.* = Inkubation.

Nativer LHCII	Nx	Lu	Chl b	Chl a	Chl gesamt	Chl a/b
Vor Ink.	0,8	2,0	5,6	8,1	13,7	1,4
Nach Ink. - WSCP	0,8	2,0	5,8	7,0	12,8	1,2
Nach Ink. + WSCP	0,8	2,0	3,6	4,6	8,2	1,3

Mittels Tieftemperaturabsorptionsspektroskopie der LHCII-Komplexe wurde zudem versucht zu bestimmen, welche Chlorophylle durch das WSCP entfernt worden sind. In Abb. 4-33 A

sieht man die bei 77 K gemessenen Absorptionsspektren von unbehandeltem nativem LHCII, sowie den mit WSCP inkubierten LHCII-Komplexen und der entsprechend behandelten Kontrollprobe. Die Spektren sind normiert auf zwei Luteinmoleküle pro LHCII-Monomer, in der Annahme, dass alle Luteine vom LHC gebunden vorliegen. Beim Vergleich der Spektren fällt auf, dass es zwischen der unbehandelten und der Kontrollprobe kaum Unterschiede gibt, während die mit WSCP inkubierte Probe deutlich abweicht – der Verlust der Chl-Moleküle zeigt sich in einer erheblich niedrigeren Amplitude des q_y -Peaks von Chl *b* bzw. Chl *a*. Der Chl *b*-Peak ist außerdem etwas verschoben – das Maximum liegt bei 648,4 nm, im Vergleich zu 649 nm bei der Kontrollprobe und der unbehandelten Probe. Des Weiteren fällt auf, dass vor allem der Peak des Chl-*b*-Maximums etwas breiter und abgeflachter erscheint als bei den Vergleichsproben. Bei genauerem Hinsehen stellt man noch fest, dass bei der mit WSCP inkubierten Probe außerdem zwei Chl-Absorptionsformen fehlen – eine im q_y -Bereich bei ca. 660 nm und eine weitere im q_x -Bereich bei 609 nm. Bei der Kontrollprobe ist die Absorptionsform bei 660 nm etwas abgeschwächt im Vergleich zu der unbehandelten Probe, jedoch noch vorhanden – dasselbe gilt für die Bande bei 609 nm.



Bei den CD-Spektren (Abb. 4-33 B) wird der Unterschied zwischen der mit WSCP inkubierten Probe und der Kontroll- bzw. der unbehandelten Probe noch viel deutlicher. Auch hier sind die Spektren auf zwei Luteine pro LHCII-Monomer normiert. Neben der deutlich geringeren Amplitude aller CD-Signale im Spektrum der mit WSCP inkubierten Probe, fallen vor allem die stark veränderten Verhältnisse der Minima zueinander auf. Bei der

unbehandelten Probe bzw. der Kontrollprobe beträgt das Verhältnis der Blauminima zueinander 1,08 bzw. 1,3; bei der mit WSCP inkubierten Probe liegt es mit 2,17 viel höher. Im Spektrum scheint das längerwellige Blauminimum regelrecht „abgeschnitten“. Auch die Verhältnisse der Rotminima zueinander unterscheiden sich stark – 1,19 bzw. 1,08 bei der unbehandelten bzw. bei der Kontrollprobe, und ein viel niedrigerer Wert von 0,78 bei der mit WSCP inkubierten Probe. Zudem scheint das erste Rotminimum von 652 auf 649 nm verschoben zu sein, obwohl es aufgrund des starken Signalrauschens schwierig ist, die genauen Lagen der Maxima und Minima zu bestimmen. Insgesamt ist also das CD-Spektrum der mit WSCP-inkubierten Probe stark verändert und erinnert kaum noch an das typische LHCII-Trimer-Spektrum, wie es bei den anderen beiden Proben zu sehen ist.

Anhand der Fluoreszenzspektren (Abb. 4-33 C) konnte schließlich noch festgestellt werden, ob die LHCII-Komplexe vor und nach der Interaktion mit WSCP intakt waren. Falls nicht, könnten die von WSCP gebundenen Chlorophylle aus dem Anteil der dissoziierten Pigmente aus zuvor zerfallenen Komplexen stammen, und es hätte somit keine Interaktion zwischen WSCP und intaktem nativem LHCII gegeben. Bei intakten LHCII-Komplexen funktioniert der Anregungsenergietransfer von Chl *b* auf Chl *a* einwandfrei und man bekommt nach Chl-*b*-Anregung (bei 470 nm) ausschließlich ein Fluoreszenzsignal von Chl *a* mit einem Maximum bei 680 nm. Die Fluoreszenzspektren in Abb. 4-33 C sind nahezu identisch. Bei der unbehandelten LHC-Probe ist keine Chl-*b*-Schulter bei 650 nm zu sehen – die Komplexe waren also vollkommen intakt. Sowohl bei der mit WSCP inkubierten Probe als auch bei der entsprechend behandelten Kontrollprobe kann man bei 650 nm nur eine sehr schwache Schulter erkennen, die bei der Kontrollprobe etwas weniger ausgeprägt ist. Es handelte sich also auch hier fast ausschließlich um intakte LHCII-Komplexe. Dieser Befund spricht dafür, dass es tatsächlich eine Interaktion zwischen nativem LHCII und WSCP gegeben hat und die vom WSCP gebundenen Chlorophylle somit aus intakten LHCs stammen.

Ein Gegenargument könnte lauten, dass die LHCII-Komplexe trotzdem im Laufe des Versuchs teilweise dissoziiert sein könnten, WSCP die freien Chlorophylle gebunden hat und man daher das freie Chl *b* nicht im Fluoreszenzspektrum sieht und somit auch nicht den Anteil der zerfallenen LHC-Komplexe. Dagegen spricht jedoch, dass die Kontrollprobe, die genauso wie die mit WSCP behandelte Probe 24 St. unter denselben Bedingungen mit Ni-Sepharose inkubiert wurde, ebenfalls (bis auf die bereits erwähnte sehr schwache Chl-*b*-Schulter) im Fluoreszenzspektrum nur intakte Komplexe aufweist. In dieser Probe war kein WSCP, welches eventuell auftretende freie Chlorophylle hätte binden können, daher wäre im Fluoreszenzspektrum deutlich zu erkennen gewesen, wenn unter diesen Versuchsbedingungen ein großer Anteil der LHC-Komplexe zerfallen wäre. Des Weiteren zeigt auch das stark veränderte CD-Spektrum der mit WSCP inkubierten LHCII-Probe (Abb. 4-33 C), dass diese Probe nicht aus vollpigmentierten intakten LHCs und freien Carotinoiden aus zerfallenen Komplexen besteht, sondern einen deutlichen Anteil an LHCII-Komplexen enthält, die eine andere Pigmentzusammensetzung besitzen.

WSCP ist demnach unter diesen Versuchsbedingungen in der Lage, nativem LHCII Chlorophylle zu entnehmen und diese selbst zu binden. Dabei wurden in diesem Fall unwesentlich mehr Chl *a* als Chl *b* vom WSCP gebunden, was zu den in Abschnitt 4.1.5 präsentierten Ergebnissen passt, dass rekombinantes BoWSCP, welches an einer Ni-Säule immobilisiert ist, keine höhere Affinität für Chl *a* zeigt. Nicht auszuschließen ist in diesem Fall

jedoch, dass der Grund hierfür auch an einer für WSCP schlechteren Zugänglichkeit der Chl- α -Moleküle im LHCII-Komplex liegen könnte.

4.2.4.2 Interaktion mit Chlorophyllase?

Wie bereits erwähnt (s. 1.2.2) ist eine der postulierten Funktionen des WSCP eine Transportfunktion für Chl zum ersten Enzym des Chl-Abbaus, der Chlorophyllase (Sato *et al.*, 1998). In diesem Fall wäre eine Interaktion zwischen WSCP und Chlorophyllase auch *in vitro* denkbar. Da WSCP auch Chlid binden kann (s. 4.1.7.3) wäre zu erwarten, dass im Falle einer Interaktion zwischen WSCP und Chlorophyllase das durch das Enzym umgesetzte Chl in Form von Chlid wieder von WSCP gebunden wird und man das Pigment in den WSCP-Komplexen mittels HPLC-Analyse nachweisen kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit rekombinatem Blumenkohl-WSCP Versuche hierzu mit chlorophyllasehaltigem Gesamtproteinextrakt aus etiolierten Roggenkeimlingen, sowie mit aufgereinigter rekombinanter Chlorophyllase aus *Triticum aestivum* (Weizen) und *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. In allen Fällen konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die Chlorophyllase unter den gewählten Versuchsbedingungen aktiv war und Chl zu Chlid umgesetzt hat. Jedoch war nach Inkubation mit Chlorophyllase in keiner der WSCP-haltigen Proben Chlid in der HPLC-Analyse nachweisbar.

Diejenigen WSCP-Proben, die mit dem chlorophyllasehaltigen Gesamtproteinextrakt aus etiolierten Roggenkeimlingen inkubiert wurden, zeigten bei anschließender nativer PAGE eine höhere PAGE-Mobilität gegenüber den unbehandelten WSCP-Kontrollproben (nicht abgebildet). Dass die erhöhte Mobilität auf einer Chlid-Bindung beruht konnte jedoch ausgeschlossen werden durch HPLC-Analyse der aus den pigmentierten Gelbanden extrahierten Pigmente – in den Proben war nur Chl enthalten. Eine Analyse der WSCP-Komplexe mittels SDS-PAGE zeigte, dass die mit dem Gesamtproteinextrakt behandelten WSCP-Proben ein um etwa 1 kDa geringeres Molekulargewicht (des Monomers) hatten, was auf einen Verdau durch die in dem Proteinextrakt noch vorhandenen Proteasen hinwies. Daher ist die höhere Mobilität dieser Proben in nativer PAGE vermutlich lediglich auf die verringerte Größe des Proteins zurückzuführen.

Unter keiner der hier ausgewählten Versuchsbedingungen konnte demnach eine Wechselwirkung zwischen rekombinatem WSCP und Chlorophyllase beobachtet werden.

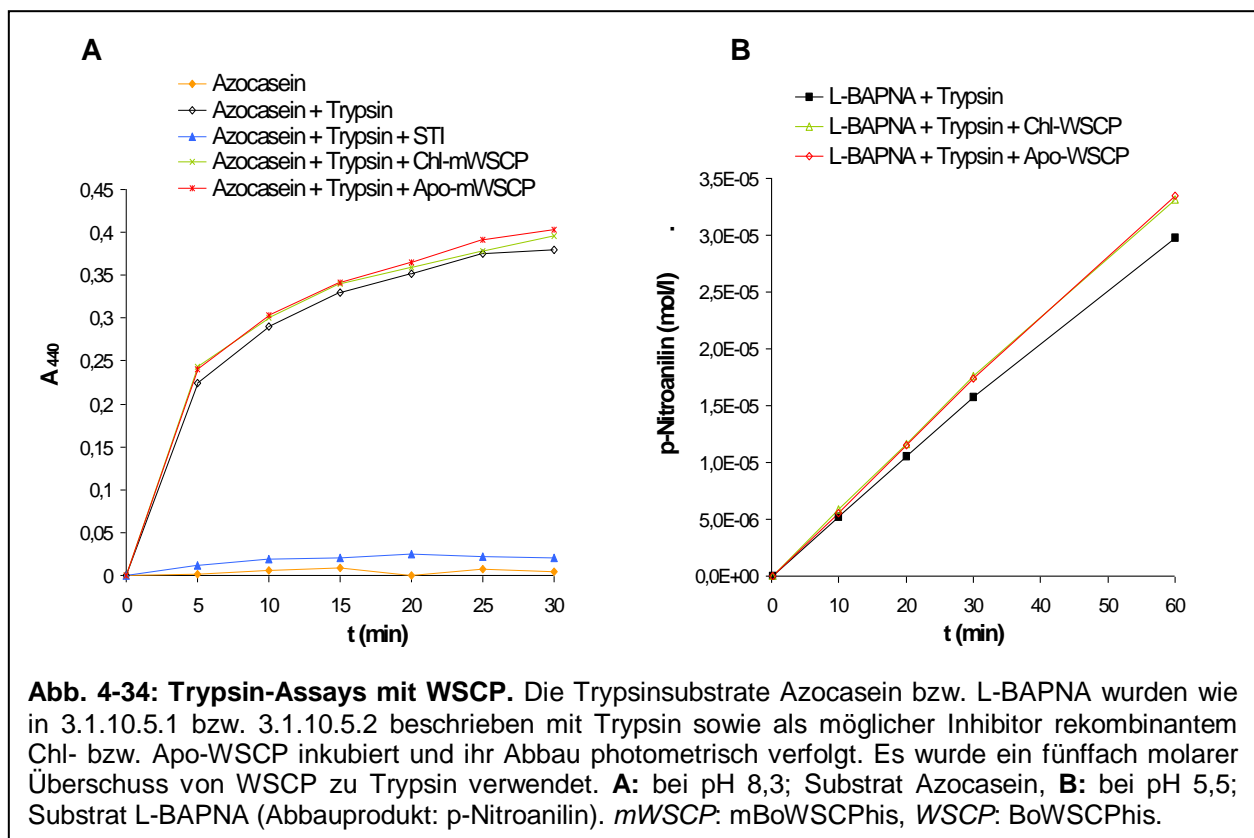
4.2.4.3 Enzyminhibitor-Assays

Aufgrund der Homologie zu Kunitz-Proteaseinhibitoren in der Aminosäuresequenz der Klasse-II-WSCPs wäre eine solche Funktion auch für sie denkbar. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Enzyminhibitor-Assays mit rekombinatem Blumenkohl-WSCP durchgeführt. Dabei wurde sowohl das pigmentierte als auch das unpigmentierte Protein auf mögliche inhibierende Eigenschaften untersucht, um gleichzeitig der Frage nachzugehen, ob die geringe Pigmentierung des WSCP möglicherweise in diesem Zusammenhang einer regulatorischen Funktion dient.

4.2.4.3.1 Trypsin

Im Rahmen der Diplomarbeit von Kristina Gundlach (2006) wurde unter Anleitung der Autorin ein Versuch durchgeführt, bei dem sich herausstellte, dass unpigmentiertes BoWSCPhis eine leicht inhibierende Wirkung auf die Serinprotease Trypsin ausübte, das pigmentierte Protein hingegen nicht. Da jedoch bei diesem Versuch das WSCP in ca. 80-fachem molarem Überschuss zu Trypsin vorlag, wurde – um die Spezifität der Hemmwirkung zu überprüfen – der Versuch in der vorliegenden Arbeit noch mal wiederholt mit einem geringeren WSCP-Überschuss. Er wurde außerdem bei zwei verschiedenen pH-Werten durchgeführt, um eine mögliche pH-Abhängigkeit festzustellen.

Des Weiteren wurden die Assays sowohl mit dem Vollängen WSCP-Klon, BoWSCPhis, durchgeführt als auch mit dem neuen, C-terminal verkürzten Klon, mBoWSCPhis (s. hierzu auch 4.1.3). Damit sollte zusätzlich der Einfluss des C-Terminus auf mögliche Proteaseinhibitoreigenschaften untersucht werden.



Für die Versuche bei pH 8,3 wurde als Substrat Azocasein verwendet, da dieses dem in Gundlach (2006) verwendeten Substrat Casein am ähnlichsten ist. Für die Versuche bei pH 5,5 musste jedoch ein anderes künstliches Trypsinsubstrat verwendet werden, L-BAPNA, da Azocasein bei pH 5,5 fast vollkommen unlöslich ist. Weder bei pH 8,3 noch bei pH 5,5 konnte eine inhibierende Wirkung auf Trypsin durch WSCP (in fünffach molarem Überschuss) festgestellt werden (Abb. 4-34). Während man in Abb. 4-34 A deutlich erkennen kann, dass unter Zugabe von dem bekannten Trypsininhibitor STI (*Soybean Trypsin Inhibitor*) nahezu kein Azocaseinabbau stattfindet, ist der Azocaseinabbau durch die WSCP-Zugabe nicht beeinträchtigt. Dabei ist kein Unterschied zwischen Chl-haltigem WSCP und

dem Apoprotein festzustellen. Durchführung des Assays mit dem Volllängenprotein (BoWSCPhis) und selbst mit zehnfach molarem WSCP zu Trypsin Überschuss brachte keine Änderung der Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Um besser einen möglichen Einfluss von WSCP auf die Trypsinaktivität bei pH 8,3 untersuchen zu können, wäre es jedoch sinnvoll den Versuch mit geänderten Enzym- bzw. Substratmengen durchzuführen, um im linearen Bereich der Reaktion zu bleiben.

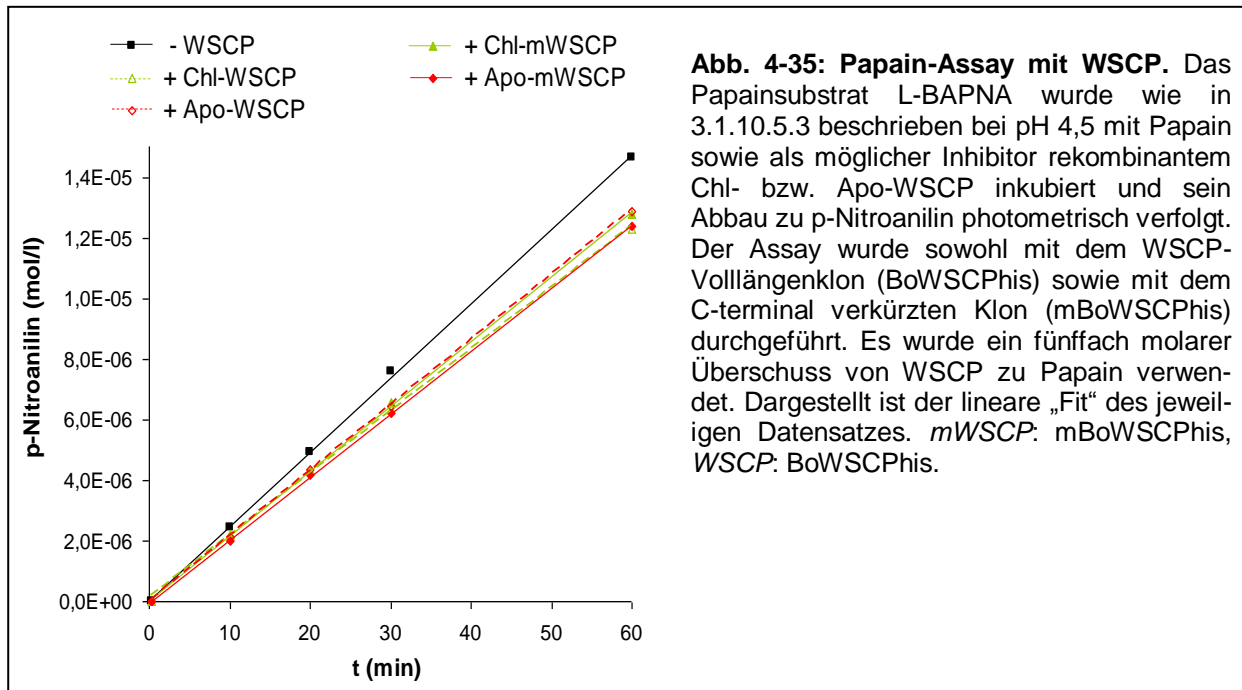
In Abb. 4-34 B sieht man, dass bei saurem pH (5,5) die WSCP-Zugabe sogar den Substratabbau durch Trypsin zu fördern scheint, da bei beiden WSCP-haltigen Proben das Produkt des L-BAPNA-Verdaus, p-Nitroanilin, etwas schneller gebildet wird als in der Probe ohne WSCP. Im linearen Bereich der Reaktion (bis 30 Min.) läuft sie ca. 11% schneller ab als ohne WSCP. Es ist jedoch wieder keinerlei Unterschied zwischen pigmentiertem und unpigmentiertem WSCP festzustellen.

Unter den hier gewählten Reaktionsbedingungen zeigte WSCP demnach keine inhibierende Wirkung auf Trypsin. Des Weiteren konnte kein Unterschied zwischen pigmentiertem und unpigmentiertem WSCP bezüglich einer möglichen Trypsininhibition festgestellt werden. Schließlich zeigte auch der C-Terminus des WSCPs keinen Einfluss auf eine mögliche Trypsininhibition, wie der Vergleich der Assays mit BoWSCPhis und mBoWSCPhis ergab.

4.2.4.3.2 Papain

In der Literatur (Halls *et al.*, 2006) ist beschrieben, dass rekombinantes unpigmentiertes WSCP aus *Arabidopsis thaliana* besonders bei niedrigem pH-Wert (4,5) eine inhibierende Wirkung auf die Cysteinproteasen Papain und die sogenannte „*proaleurain maturation protease*“ besitzt. Ebenso ist in Halls *et al.* beschrieben, dass ein WSCP aus der Infloreszenz von Blumenkohl mit der „*proaleurain maturation protease*“ ko-lokalisiert bzw. interagiert und sie vermutlich auch inhibiert. Dieses Blumenkohl-WSCP (in der NCBI-Datenbank als WSCP2 beschrieben) ist in seiner Aminosäuresequenz zu 54% identisch mit dem im Rahmen dieser Arbeit erforschten WSCP (in der NCBI-Datenbank als WSCP1 beschrieben) aus Blumenkohl-Blättern.

Daher wurde untersucht, ob das in dieser Arbeit verwendete rekombinante Blumenkohl-WSCP ebenfalls bei niedrigem pH-Wert eine inhibierende Wirkung auf Papain zeigt. Die Papain-Assays wurden mit pigmentiertem und unpigmentiertem BoWSCPhis und mBoWSCPhis durchgeführt, um – wie bereits in 4.2.4.3.1 für Trypsin beschrieben – sowohl den Einfluss der Chl-Bindung als auch den des WSCP-C-Terminus auf die Papainaktivität zu untersuchen.



Die Papain-Assays haben reproduzierbar ergeben, dass die Aktivität des Enzyms in Gegenwart von WSCP etwas gebremst wird. In Abb. 4-35 kann man sehen, dass der Abbau von L-BAPNA zu p-Nitroanilin in allen WSCP-haltigen Proben langsamer verläuft als ohne WSCP. Die Versuchsergebnisse sind in Tab. 4-9 zusammengefasst. Im Durchschnitt ergibt sich eine Papainaktivität von ca. 86% in Gegenwart von WSCP, verglichen mit der als 100% gesetzten Enzymaktivität ohne WSCP.

	pH 4,5	pH 4,5	pH 5,5
ohne WSCP	100%	100%	100%
+ Chl- WSCP			
(m)	84%	87%	87%
(v)	k.A.	83%	k.A.
+ Apo- WSCP			
(m)	87%	85%	87%
(v)	84%	88%	k.A.

Tab. 4-9: Einfluss von WSCP auf die Aktivität von Papain. Der Papain-Assay wurde bei pH 4,5 und 5,5 mit pigmentiertem und unpigmentiertem WSCP durchgeführt; bei pH 4,5 mit den verschiedenen WSCP-Proteinen BoWSCP_{Phis} und mBoWSCP_{Phis}. Die Papainaktivität ohne WSCP wurde als 100% gesetzt; durch Vergleich der Steigung der linearen „Fits“ (Abb. 4-35) wurde die jeweilige Papainaktivität mit WSCP berechnet. *m*: C-terminal verkürztes „matures“ WSCP (mBoWSCP_{Phis}), *v*: Volllängen-WSCP (BoWSCP_{Phis}), *k.A.*: keine Angabe möglich.

WSCP zeigt bei beiden untersuchten pH-Werten die gleiche Wirkung auf die Papainaktivität (Tab. 4-9). Es ist jedoch wieder kein signifikanter Unterschied zwischen pigmentiertem und unpigmentiertem WSCP sowie zwischen dem Volllängenprotein (BoWSCP_{Phis}) und dem C-terminal verkürzten Protein (mBoWSCP_{Phis}) festzustellen.

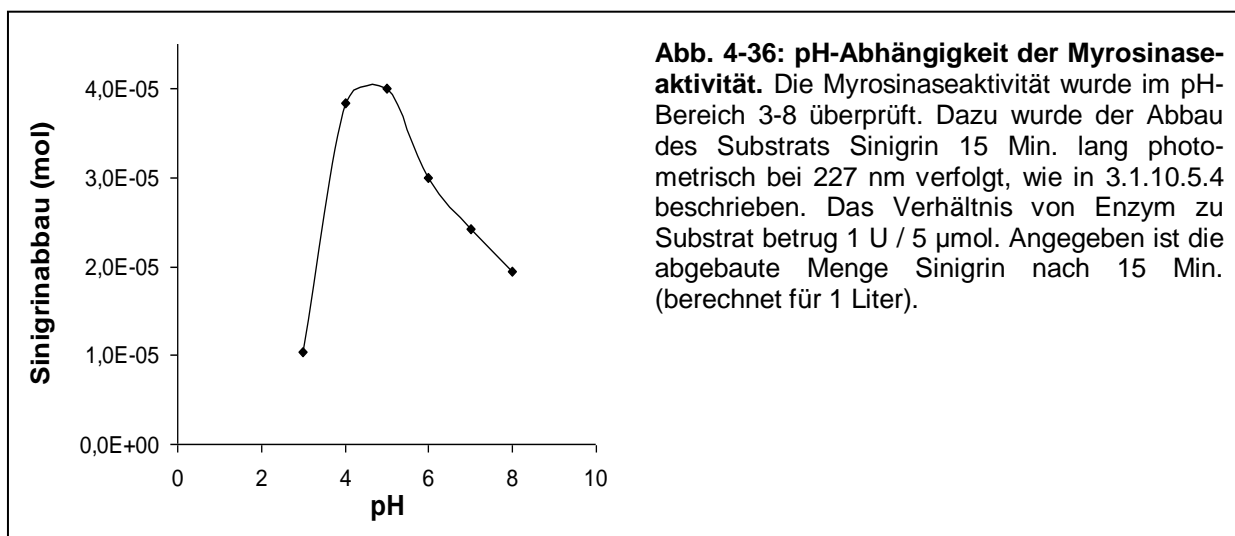
4.2.4.3.3 Myrosinase

Das Enzym Myrosinase (Thioglucosidase) ist verantwortlich für die für Brassicaceen typische „Senfölbombe“, die eine Abwehrreaktion bei Gewebeverletzungen darstellt. Das vorher in den sogenannten Myrosinzellen kompartimentierte Enzym kommt dabei mit seinem Substrat

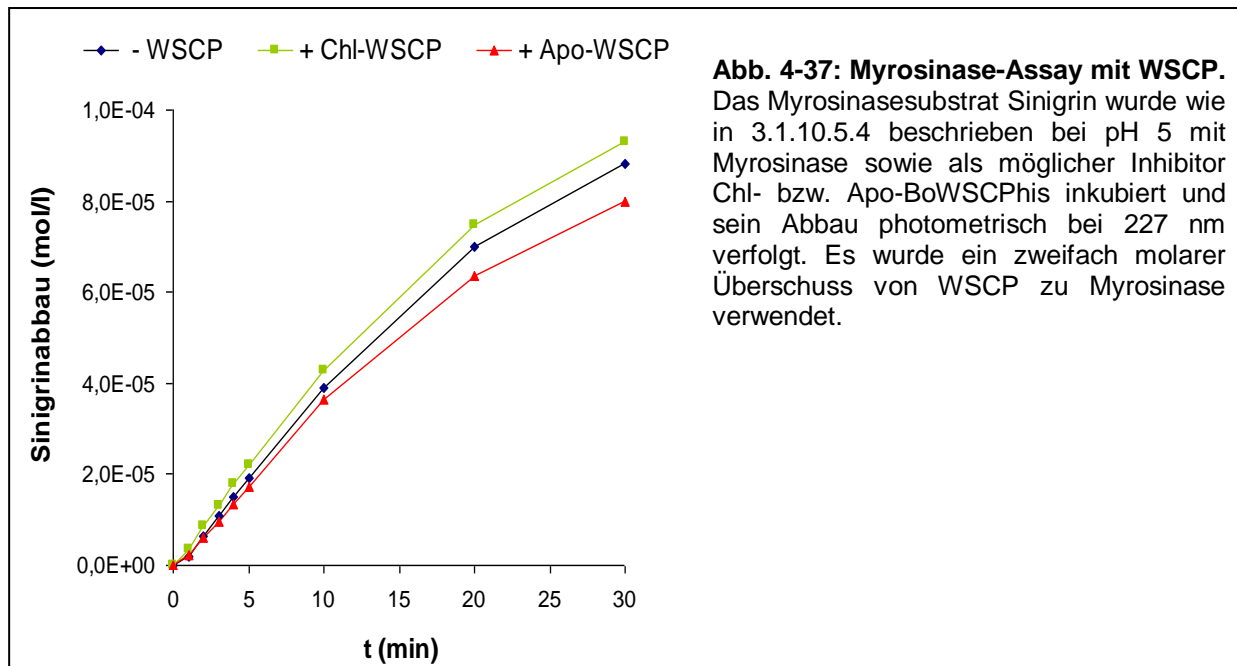
in Kontakt und setzt bei seiner Spaltung Senföl frei, welches einen stechenden Geruch besitzt und somit z.B. einen Schutz gegen Fraßfeinde darstellt (Bennett und Wallsgrove, 1994).

Satoh und Mitarbeiter fanden Hinweise darauf, dass WSCP in *Lepidium virginicum* in den Myrosinzellen exprimiert wird (unveröffentlichte Ergebnisse). Somit stellt sich die Frage, ob WSCP ein potentieller Interaktionspartner von Myrosinase sein könnte. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, indem Myrosinase-Assays mit und ohne rekombinantem Blumenkohl-WSCP durchgeführt wurden. Dabei wurde – wie bereits bei den Trypsin- und Papain-Assays – wieder pigmentiertes und unpigmentiertes WSCP verglichen, um zu untersuchen, ob die Chl-Bindung möglicherweise eine regulatorische Aufgabe bei der WSCP-Funktion besitzt.

Die Myrosinase-Assays sollten wie in der Literatur beschrieben durchgeführt werden (Palmieri *et al.*, 1982; Botti *et al.*, 1995), allerdings zeigte sich in Vorversuchen, dass die Myrosinaseaktivität bei dem in der Literatur genannten pH-Wert von 7 recht gering war und keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden konnten. Daher musste das pH-Optimum des Enzyms (Myrosinase aus *Sinapis alba*, von Sigma) ermittelt werden. Es zeigte sich, dass ein pH-Wert von ca. 5 optimal für die Enzymaktivität ist (Abb. 4-36), daher wurden – abweichend zu den Literaturangaben – alle Myrosinase-Assays bei diesem pH-Wert durchgeführt.



Betrachtet man Abb. 4-37, so sieht man leichte Unterschiede in der Myrosinaseaktivität mit und ohne WSCP. Zudem scheint es, als würden Chl- und Apo-WSCP eine gegensätzliche Wirkung auf die Myrosinaseaktivität ausüben – Chl-WSCP fördert möglicherweise die Enzymaktivität (ein entsprechender Kontrollversuch ohne Myrosinase lieferte jedoch keinen Hinweis dafür, dass Chl-WSCP selbst Thioglucosidaseaktivität besitzt), Apo-WSCP scheint sie ein wenig zu hemmen. Wenn man allerdings nur den linearen Bereich des Graphen (0-10 Min.) berücksichtigt, kann kein richtiger Unterschied zwischen den drei Versuchsansätzen festgestellt werden. Der Versuch müsste demnach noch mal wiederholt werden, um die Reproduzierbarkeit zu untersuchen, und am besten mit einer geringeren Enzymmenge, um während der gesamten Versuchsdauer einen linearen Verlauf des Substratabbaus zu haben.



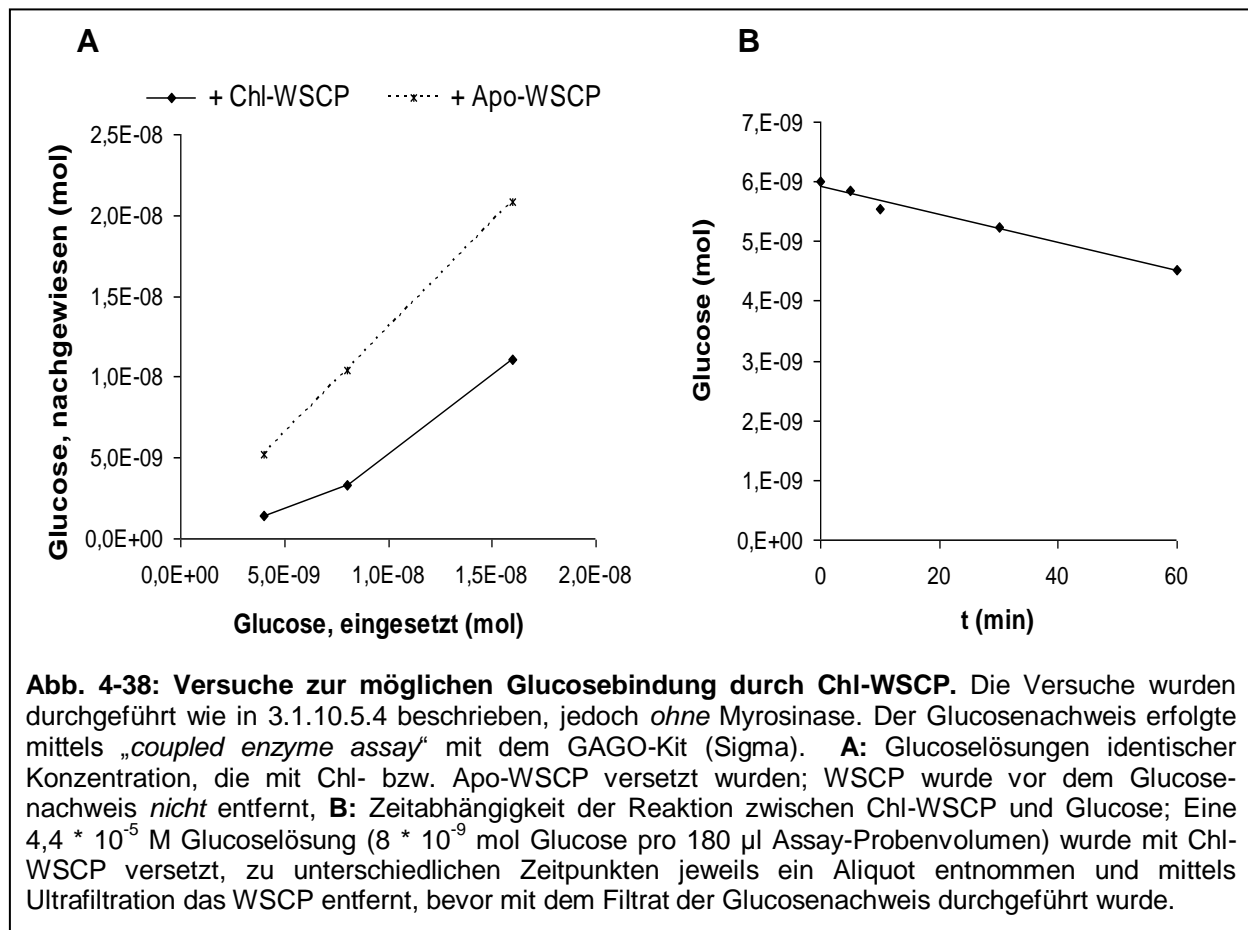
Es sollte an dieser Stelle erwähnt werden, dass bei dem hier abgebildeten Assay der Substratabbau und somit die Enzymaktivität direkt beobachtet werden konnte durch Messen der Substratabsorption bei 227 nm. Da Messungen im UV-Bereich fehleranfällig sind, wurde die Myrosinaseaktivität mehrfach auch mittels „*coupled enzyme assay*“ gemessen. Dabei wurde nicht direkt der Sinigrinabbau gemessen, sondern mittels eines colorimetrischen Nachweises mit zwei weiteren Enzymreaktionen (Glucoseoxidase/Peroxidase) die beim Sinigrinabbau entstehende Glucose bei 540 nm gemessen (GAGO-Kit von Sigma).

Dieser Assay ergab sehr reproduzierbare Ergebnisse, die jedoch stark von den in Abb. 4-37 dargestellten Ergebnissen abwichen. Sie zeigten bei den Proben, die Chl-WSCP enthielten, eine deutliche Beeinträchtigung der Myrosinaseaktivität, während Apo-WSCP einen leicht fördernden Effekt hatte. Schließlich ergab jedoch ein Kontrollversuch *ohne* Myrosinase, bei dem Lösungen mit *identischer* Glucosekonzentration sowohl mit Apo- als auch mit Chl-WSCP inkubiert wurden, dass auch hier der Glucosenachweis bei den Chl-WSCP-Proben niedriger ausfiel als bei den Apo-WSCP-Proben (Abb. 4-38 A), obwohl – wie erwähnt – den Proben jeweils identische Glucosemengen zugegeben wurden. Somit schienen die Ergebnisse der mittels „*coupled enzyme assay*“ durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss des WSCP auf die Myrosinaseaktivität nur auf einem Artefakt zu beruhen, da Chl-WSCP unter Umständen eine Substanz enthält (möglicherweise verschleppte Lipide aus der Pigmentlösung), die beim Glucosenachweis-Kit störend wirkt. Im folgenden Abschnitt wird auf diese Beobachtung noch etwas näher eingegangen.

4.2.4.4 Bindet WSCP Glucose?

Im vorigen Abschnitt wurde beschrieben, dass eine Glucoselösung, die mit Chl-haltigem WSCP versetzt wurde, weniger Glucose zu enthalten schien als eine identisch konzentrierte Glucoselösung, die mit unpigmentiertem WSCP versetzt wurde. Mit dem Glucosenachweis-Kit (GAGO-Kit, Sigma) wurde bei den Chl-WSCP-haltigen Proben nur ca. 1/4-1/2 der

eigentlich enthaltenen Glucosemenge nachgewiesen (Abb. 4-38 A). Um auszuschließen, dass das Chl-WSCP mit einer der Komponenten des Kits interagiert und somit stört, wurde bei einem weiteren Kontrollversuch vor dem Glucosenachweis das WSCP mittels Ultrafiltration von der Glucoselösung wieder abgetrennt. Dabei hat sich ergeben, dass die Glucoseprobe, in der zuvor Chl-WSCP enthalten war, sogar nur ca. 1/6 soviel Glucose enthielt wie die entsprechende Probe mit Apo-WSCP. Der Unterschied zwischen den Proben schien dabei umso größer zu sein, je länger die Glucoselösungen mit der entsprechenden WSCP-Lösung inkubiert wurden.



Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass Chl-haltiges WSCP unter Umständen Glucose binden kann und diese somit in den Kontrollversuchen nicht mehr für den Glucosenachweis zur Verfügung stand. Um dies näher zu untersuchen, wurde die Zeitabhängigkeit der möglicherweise zwischen Chl-WSCP und Glucose stattfindenden Reaktion gemessen. Dazu wurde eine Glucoselösung mit einer definierten Glucosekonzentration angesetzt, diese mit Chl-WSCP inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus der Lösung eine Probe entnommen und das Chl-WSCP mittels Ultrafiltration entfernt. Die in der Probe enthaltene Glucosemenge wurde mit dem Glucosenachweis-Kit colorimetrisch mittels „coupled enzyme assay“ bestimmt. Dabei zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Inkubationsdauer mit Chl-WSCP und der in der Probe nachgewiesenen Menge Glucose, wobei umso weniger Glucose enthalten war, je länger mit Chl-WSCP inkubiert wurde (Abb. 4-38 B). Bereits zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde weniger Glucose in der Lösung nachgewiesen als erwartet – der Wert liegt bei $6 \cdot 10^{-9}$ mol Glucose, obwohl in der Ausgangslösung $8 \cdot 10^{-9}$

mol Glucose vorhanden sein sollten. Bei der Probe „t = 0“ wurde unmittelbar nach Zugabe des Chl-WSCP zur Glucoselösung das Protein mittels Ultrafiltration entfernt; jedoch fand dabei bereits ein kurzer Kontakt zwischen Chl-WSCP und Glucose statt, da es einige Minuten dauert, bis das Protein mit dieser Methode vom Rest der Lösung abgetrennt werden kann.

Falls WSCP tatsächlich Glucose binden kann, wäre es auch denkbar, dass es das Myrosinasesubstrat Sinigrin über dessen Glucosegruppe binden kann. Weiterführende Versuche zur möglichen Bindung von Sinigrin durch WSCP lieferten hierzu jedoch keine eindeutigen Ergebnisse und konnten aus zeitlichen Gründen nicht weiter verfolgt werden.

Trotz der hier recht deutlich scheinenden Hinweise, dass Chl-WSCP Glucose binden kann, müssen diese Ergebnisse mit Vorsicht betrachtet werden. Diejenigen Proben, bei denen vor dem Glucosenachweis das Chl-WSCP mittels Ultrafiltration entfernt wurde und die somit genauso farblos waren wie die anderen Proben, zeigten beim colorimetrischen Glucosenachweis mittels „*coupled enzyme assay*“ eine deutlich andere Färbung als die übrigen Proben (Abb. 4-39, näheres zur Farbreaktion des Assays s. 3.1.10.5.4). Während die Proben normalerweise eine rötlich-braune Farbe während der Enzymreaktion annehmen (bedingt durch oxidiertes o-Dianisidin nach Reaktion mit H_2O_2 , katalysiert von der Peroxidase), zeigten die zuvor Chl-WSCP-haltigen Proben eine gelb-grüne Färbung, obwohl sie vor der Enzymreaktion farblos waren und somit keine (sichtbare) Verunreinigung mit Chl-WSCP vorlag, was dies als eine mögliche Erklärung für die grüne Farbe ausschließt. Auch der Verdacht, dass verschleppte Lipide aus dem für die Rekonstitution von Chl-WSCP verwendeten Pigmenttotal-extrakt (TE) hierfür verantwortlich sein könnten, konnte in entsprechenden Kontrollversuchen mit Lipidmischungen, die der im TE zu erwartenden Lipidzusammensetzung entsprachen, nicht bestätigt werden. Schließlich konnten auch Ni^{2+} -Ionen, die während der Rekonstitution auf der Ni-Säule möglicherweise als Verunreinigung in die Chl-WSCP-Probe gelangt sein könnten, in entsprechenden Kontrollversuchen als Grund für die abweichende Färbung der zuvor Chl-WSCP-haltigen Proben ausgeschlossen werden – Ni^{2+} -Ionen hatten keinen Einfluss auf das Ergebnis des Glucose-Assays.

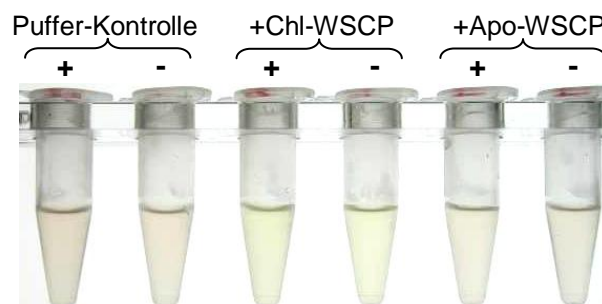


Abb. 4-39: Vergleich der Färbung der WSCP- und Kontrollproben beim Glucosenachweis mittels „*coupled enzyme assay*“. Glucoselösungen mit identischer Konzentration wurden mit Chl-WSCP, Apo-WSCP und als Kontrolle mit WSCP-Elutionspuffer (in dem sich die WSCP-Komplexe befinden) 1,5 St. bei RT inkubiert (je 2 Proben). Anschließend wurde jeweils eine der Proben gekocht (+), um die Bedingungen des Myrosinase-Assays zu simulieren (vgl. 3.1.10.5.4), die andere blieb unbehandelt (-). Die Proben wurden dann mittels Ultrafiltration in Amicon-Röhrchen (30 kDa MWCO) von WSCP befreit. Mit dem Filtrat wurde der Glucosenachweis nach Herstellerangaben durchgeführt (GAGO-Kit von Sigma). Abgebildet sind die Proben nach 15 Min. Reaktionszeit (Gesamtreaktionszeit beträgt 30 Min.), d.h. vor dem endgültigen Abbruch der Reaktion durch Zugabe von H_2SO_4 ; dargestellt ist demnach das gefärbte Zwischenprodukt der Reaktion (oxidiertes o-Dianisidin).

Bei dem in Abb. 4-39 dargestellten Versuch wurde in den beiden „Chl-WSCP“-Proben nur ca. $3,6 \cdot 10^{-10}$ mol Glucose nachgewiesen, im Gegensatz zu den anderen vier Proben, bei denen jeweils $9,4 \cdot 10^{-9}$ mol Glucose nachgewiesen wurden – es liegt also ein Faktor von 26 zwischen den Proben, obwohl sie alle mit identischer Glucosemenge angesetzt wurden. Ein Grund, weshalb der Unterschied zwischen den „Chl-WSCP“-Proben und den anderen Proben bei diesem Versuch so viel größer war als sonst, könnte die lange Inkubationszeit sein, da hier 90 Min. inkubiert wurde, im Gegensatz zu den anderen Kontrollversuchen, bei denen die Inkubationszeit mit WSCP nur ca. 5 Min. betrug. In dem in Abb. 4-38 B dargestellten Kontrollversuch zur Zeitabhängigkeit der Reaktion zwischen Chl-WSCP und Glucose wurden jedoch nach 60 Min. Inkubationszeit mit Chl-WSCP noch $4,5 \cdot 10^{-9}$ mol Glucose nachgewiesen. Extrapoliert man den linearen Graphen, müssten nach 90 Min. Inkubationszeit noch ca. $4 \cdot 10^{-9}$ mol Glucose in der Probe enthalten sein. Das liegt immer noch um eine Zehnerpotenz höher als die hier gemessenen Werte. Der einzige Unterschied zwischen dem in Abb. 4-38 B und dem hier verwendeten Chl-WSCP ist, dass hier das C-terminal verkürzte WSCP (mBoWSCP_{His}) verwendet wurde und im anderen Fall das Volllängenprotein (BoWSCP_{His}).

4.2.4.5 Häm-Bindungsversuche

Da WSCP nachweislich auch einige Chl-Derivate binden kann, die ein anderes Zentralatom als Mg besitzen (Schmidt, 2003), sollte untersucht werden, ob das Protein auch Häm binden kann, also eine Komplexverbindung aus Porphyrin und einem zentralen Eisen-Atom. Falls eine Bindung stattfindet, könnte dies ein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung des WSCP am Häm-Stoffwechsel sein, z.B. als Interaktionspartner der Ferrochelatase.

Rekombinantes Blumenkohl-WSCP wurde dafür im Prinzip nach der gleichen Methode wie bei der Rekonstitution mit Chl mit Hämin inkubiert und anschließend aufgereinigt. Es mussten jedoch einige kleine Änderungen eingeführt werden, da Hämin – anders als Chl – nicht bzw. kaum in Ethanol löslich ist und daher in NaOH vorgelöst werden musste. Es wurde sowohl eine Aufreinigung auf der Ni-Säule als auch mittels nativer PAGE versucht. Bei beiden Methoden kam es zu Aggregationsprodukten des Hämins.

Mit keiner der versuchten Rekonstitutionsvarianten konnte eine Bindung des Häms nachgewiesen bzw. festgestellt werden.

5 Diskussion

Obwohl wasserlösliche, Chlorophyll-bindende Proteine (WSCPs) bereits vor 45 Jahren entdeckt wurden (Yakushiji *et al.*, 1963), sind sie vergleichbar wenig untersucht. Dabei handelt es sich bei WSCP um ein Protein mit sehr außergewöhnlichen Eigenschaften, vor allem seine Stabilität betreffend, die es zu einem interessanten und vielversprechenden Forschungsobjekt machen. Es sind noch viele Fragen zu WSCPs offen, vor allem bezüglich ihrer Funktion in der Pflanze. Eines der Ziele dieser Arbeit war es, der Antwort auf diese Frage näher zu kommen.

Die Experimente, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, lassen sich in zwei Hauptbereiche gliedern: 1) Experimente zur biochemischen Charakterisierung von WSCP, und 2) Experimente zur biologischen Funktion von WSCP. Im Rahmen der ersteren wurden vor allem Stabilitätsuntersuchungen sowie Messungen zu den Eigenschaften der gebundenen Chlorophylle durchgeführt. Bei den Experimenten zur biologischen Funktion wurden einerseits WSCP-*knock-out*-Pflanzen unter verschiedenen Bedingungen charakterisiert, andererseits wurden Experimente mit rekombinantem WSCP durchgeführt, um eine mögliche Interaktion mit anderen Proteinen zu detektieren, die einen Hinweis auf die Funktion von WSCP liefern könnte. Alle Versuche wurden mit rekombinantem WSCP durchgeführt – natives WSCP diente nur als Referenz bei einigen Versuchen.

5.1 Versuche zur biochemischen Charakterisierung von WSCP

5.1.1 Der Phytolschwanz ist essentiell für die Stabilität von WSCP-Oligomeren, nicht aber für deren Bildung

Natives WSCP, welches aus Blumenkohlblättern isoliert wird, ist mit Chl pigmentiert und liegt als Tetramer und zum Teil auch als höheres Oligomer (z.B. Hexamer) vor (Satoh *et al.*, 1998). Das unpigmentierte Apoprotein sowie das mit Chlid pigmentierte WSCP werden hingegen als Monomer beschrieben (Schmidt *et al.*, 2003). Daraus wurde gefolgert, dass der Phytolschwanz der Chlorophylle der entscheidende Faktor für die Tetramerisierung des WSCP ist. Auch die Ergebnisse von Horigome *et al.* (2007) unterstützen diese Aussage; die bei 2 Å aufgelöste Struktur des tetrameren WSCP aus *Lepidium virginicum* (LwWSCP) zeigt vier Chlorophylle, die so eng benachbart sind, dass ihre Phytolschwänze im Zentrum des Tetramers hydrophobe Wechselwirkungen miteinander eingehen. Die Autoren postulieren, dass diese hydrophoben Wechselwirkungen die treibende Kraft der Tetramerisierung des mit Chl pigmentierten WSCP-Komplexes sind.

In der vorliegenden Arbeit hat sich jedoch reproduzierbar gezeigt, dass auch das unpigmentierte Blumenkohl-WSCP als Tetramer bzw. höheres Oligomer vorliegt, wenn man es unter schonenden Bedingungen behandelt. Bei nativer PAGE, die mit detergensfreiem Laufpuffer durchgeführt wurde, zeigte das Apoprotein vergleichbare Laufeigenschaften wie Chl-WSCP. Das unpigmentierte Vollängenprotein, BoWSCP_{His}, wies unter diesen Bedingungen sogar kaum eine Tetramerbande auf, sondern kam fast ausschließlich als

höheres Oligomer vor, vermutlich auch bedingt durch unspezifische Aggregation. Bei stringenteren Elektrophoresebedingungen, d.h. unter Verwendung von detergenshaltigem (Deriphat-) Laufpuffer, zerfielen jedoch die höheren Oligomere des Apoproteins zu Monomeren (s. 4.1.7.3), wie bereits in Schmidt *et al.* (2003) für vergleichbare PAGE-Bedingungen beschrieben. Chlid-WSCP verhielt sich ähnlich, zerfiel jedoch nicht vollständig zu Monomeren, sondern anscheinend eher zu Dimeren – dabei dissoziierte das Chlid von ca. der Hälfte der Komplexe ab, die andere Hälfte blieb aber an den Dimeren gebunden.

Satoh *et al.* haben 1998 ebenfalls unpigmentiertes Blumenkohl-WSCP mittels detergensfreier nativer PAGE untersucht und sahen, dass das Protein – im Gegensatz zu den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen – hauptsächlich als Monomer vorkommt, mit einem weiteren großen Dimeranteil sowie vernachlässigbaren Anteilen an Tetrameren und höheren Oligomeren. Ihre Ergebnisse sind also vereinbar mit den bereits erwähnten Ergebnissen von Schmidt *et al.* (2003). Allerdings haben sie das rekombinante Fusionsprotein aus dem Maltose-bindenden Protein (MBP) und WSCP untersucht (MBP-WSCP); in dieser Arbeit und bei Schmidt *et al.* wurde hingegen rekombinantes WSCP, welches N-terminal einen Hexahistidylrest trägt, untersucht (BoWSCP_{His}). Möglicherweise bewirkt also die Kopplung an das MBP eine Destabilisierung des WSCP und die Ergebnisse sind somit nicht direkt mit denen aus dieser Arbeit vergleichbar. Ein destabilisierender Effekt von MBP auf sein Fusionsprotein ist beispielsweise in Blondel *et al.* (1996) beschrieben.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass der Phytolschwanz der Chlorophylle für die Tetramerisierung des WSCP nicht ausschlaggebend ist, jedoch einen bedeutenden Faktor für die Stabilität des Tetramers bzw. höheren Oligomers darstellt. Die Wichtigkeit des Phytolschwanzes für die Komplex-Stabilität zeigte sich auch bei den Untersuchungen zur Temperaturstabilität – während Chl-WSCP eine einstündige Hitzebehandlung bei 95°C übersteht, ohne dass das Protein denaturiert oder in Monomere zerfällt (s. 4.1.7.1), denaturiert das Apoprotein und auch Chlid-WSCP bereits ab ca. 60°C (vgl. hierzu auch Weil, 2007 (Diplomarbeit)). Die Stabilität der Chl-WSCP-Komplexe geht so weit, dass selbst bei einer denaturierenden SDS-PAGE, unter stark reduzierenden Bedingungen, nicht alle Komplexe zu Monomeren zerfallen, sondern meistens ein geringer Anteil an Dimeren noch vorhanden bleibt (Daten nicht gezeigt). Apo-WSCP, hingegen, zerfällt unter diesen Bedingungen vollständig in seine Untereinheiten. Die hydrophoben Wechselwirkungen der Phytolschwänze der an WSCP gebundenen Chlorophylle erhöhen demnach die Stabilität des WSCP-Tetramers beträchtlich.

Generell ließ sich noch beobachten, dass das Volllängenprotein, BoWSCP_{His}, bei nativer PAGE einen großen Anteil an höheren Oligomeren (Hexamere und größer) ausbildet, wohingegen das C-terminal verkürzte Protein, mBoWSCP_{His}, weitaus weniger höhere Oligomere formt (s. Abb. 4-16) und sich somit eher wie das native BoWSCP verhält. Dies zeigte sich auch darin, dass BoWSCP_{His} weitaus stärker zu Aggregation neigt als mBoWSCP_{His} (vgl. 4.1.3). Es ist jedoch unklar, ob dies durch Vernetzung der pigmentierten Komplexe über Chlorophylle geschieht, oder ob der bei BoWSCP_{His} noch vorhandene C-Terminus für die Aggregationsneigung verantwortlich ist. Wahrscheinlicher ist auf jeden Fall Letzteres. Ein Hydrophobizitätsplot ergab, dass der C-Terminus der WSCP-Sequenz hydrophobe Eigenschaften besitzt (Gundlach, 2006 (Diplomarbeit)); auch Satoh *et al.* (1998) beschreiben diesen Bereich als hydrophob. Es ist also gut vorstellbar, dass sich die C-

Termini der BoWSCPhis-Komplexe im wässrigen Medium zusammenlagern und somit hydrophobe Wechselwirkungen eingehen, die zu „WSCP-Superkomplexen“ führen.

Interessant ist auch die Beobachtung, dass unter stringenten PAGE-Bedingungen (mit Deriphat-Laufpuffer) ein geringer Anteil der Chl-WSCP-Komplexe (auch das als Vergleich dienende native BoWSCP) zu einer niedermolekularen Form zerfällt, bei der es sich höchstwahrscheinlich um Dimere handelt. Diese Dimere zeigen auch bei Anregung mit UV-Licht eine Fluoreszenz (s. Abb. 4-16), woraus man schließen kann, dass sie noch Chlorophylle gebunden haben. Satoh *et al.* (1998) beobachteten zwar ebenfalls WSCP-Dimere, jedoch konnten sie Chl-Fluoreszenz ausschließlich bei den Tetrameren und Hexameren feststellen. Es handelte sich aber wie bereits erwähnt dabei um MBP-WSCP, nicht um BoWSCPhis. Möglicherweise verringert also die Fusion des WSCP an MBP die Stabilität der Chl-Bindung an das Protein.

5.1.2 Unpigmentiertes und pigmentiertes WSCP sind leicht unterschiedlich gefaltet

Das unpigmentierte WSCP-Apoprotein zeigt zwar ein ähnliches oder sogar gleiches Oligomerisierungsverhalten wie Chl-WSCP, was auf eine ähnliche Faltung hinweist, ist aber wesentlich weniger stabil (vgl. 5.1.1). Weitere Indizien dafür, dass Apo- und Chl-WSCP ähnlich gefaltet sind, lieferten die Ergebnisse von Proteaseverdaulichkeitsversuchen, bei der sich das Apoprotein fast genauso proteaseresistent erwies wie das mit Chl pigmentierte Protein (Gundlach, 2006 (Diplomarbeit)). Um der Frage nachzugehen, ob die Stabilitätsunterschiede durch eine unterschiedliche Konformation bedingt sind, oder ob das Apoprotein auch ohne die Pigmente bereits die gleiche Konformation annimmt wie das pigmentierte Protein und somit die extrem hohe Stabilität alleine auf der Chl-Bindung und der daraus resultierenden Wechselwirkungen beruht, wurden UV-CD-Spektren der WSCP-Komplexe gemessen. Aus den gemessenen Spektren im Wellenlängenbereich 190-250 nm kann zwar nicht die Tertiärstruktur der Proteinproben direkt bestimmt werden, aber es können die relativen Sekundärstrukturanteile des jeweiligen Proteins ermittelt werden und somit Indizien dafür erhalten werden, ob das WSCP-Apoprotein und das pigmentierte Protein gleich gefaltet sind.

Die im UV-Bereich gemessenen CD-Spektren von unpigmentiertem und pigmentiertem BoWSCPhis sowie mBoWSCPhis unterschieden sich alle in ihrer Amplitude und in ihrem Signalverlauf (s. 4.1.9). Trotzdem ergab die Analyse der Spektren mittels geeigneter Software (CDSSTR, über DichroWeb, s. 3.1.15.2.2) für alle Proben vergleichbare Anteile an den jeweiligen Sekundärstrukturen. Dazu muss jedoch angemerkt werden, dass von den Autoren der Analyse-Software angegeben wird, dass die Genauigkeit der Analyse der UV-CD-Spektren von Proteinen mit einem hohen Sekundärstrukturanteil an β -Faltblatt und Zufallsknäuel, wie es bei WSCP der Fall ist, nur zwischen 50 und 75% liegt. Laut Analyse enthalten alle Proben einen kleinen helikalen Anteil von 7-10% (wobei die Standardabweichung hier zwischen 80 und 100% liegt), sowie 31-34% ungeordnete Strukturen. WSCP aus *Lepidium virginicum* enthält keine α -helikalen Bereiche (Horigome *et al.*, 2007), aber eine Strukturvorhersage aus der Aminosäuresequenz von BoWSCP mit dem Programm SwissModel ergab eine sehr kurze Helix aus drei Aminosäureresten (V112-S114) im WSCP-Monomer (Daten nicht gezeigt). Der größte Anteil besteht aus β -

Sekundärstrukturelementen: 32-38% β -Stränge und 22-25% β -Schleifen. Die einzelnen Analysen sind im Anhang unter 8.5 aufgeführt. Diese Ergebnisse stimmen gut überein mit den bisherigen Strukturdaten von WSCP (aus *Lepidium virginicum*), die einen hohen β -Strukturanteil zeigen, bestehend aus 12 β -Strängen, welche zusammen ein β -Fass sowie drei antiparallele β -Faltblätter formen (Horigome *et al.*, 2007).

Es stellt sich natürlich die Frage, aus welchem Grund sich die CD-Spektren der vier WSCP-Proben so stark unterscheiden, wenn doch alle Proben vergleichbare Anteile der jeweiligen Sekundärstrukturen enthalten. Generell ist es bei der Analyse von UV-CD-Spektren sehr wichtig, dass präzise Werte für die Proteinkonzentration angegeben werden (Whitmore und Wallace, 2004). Um die Spektren von Proben unterschiedlicher Konzentration direkt vergleichen zu können, müssen nämlich die ursprünglichen Messdaten, die in θ (relative Einheiten, in Milligrad) gemessen werden, in die Einheit $\Delta\epsilon$ (molare Absorption pro Aminosäurerest, in Milligrad pro molar und cm) umgerechnet werden. Dazu wird neben der exakten Weglänge der Küvette und dem „*mean residue weight*“ (mittleres Gewicht pro Aminosäurerest) die genaue Proteinkonzentration der gemessenen Probe benötigt. Da es bei den WSCP-Proben – vor allem beim pigmentierten Protein – bei der genauen Bestimmung der Proteinkonzentration oft Schwierigkeiten gab (s. hierzu 4.1.4), könnten falsche Angaben hierzu bei der Auswertung der Spektren dazu geführt haben, dass sie sich so stark in ihren Amplituden unterscheiden, da die Amplitude des Spektrums bei der Konvertierung direkt von der angegebenen Proteinkonzentration abhängt. Das erklärt jedoch noch nicht die Unterschiede im Verlauf bzw. in der Form der Spektren.

Unterschiede in den Amplituden und Formen der UV-CD-Spektren von β -Strang-Proteinen mit gleicher Proteinkonzentration und gleichen Sekundärstrukturanteilen können aber auch auf unterschiedlich stark verdrehten β -Strukturen beruhen (Manning *et al.*, 1988; Berova *et al.*, 2000). Eine Verdrehung bzw. Verzerrung eines β -Faltblatts führt zu einer gesteigerten Signalintensität und zu signifikanten Verschiebungen der Signalposition (Manning *et al.*, 1988). Wenn davon ausgegangen wird, dass die Probenkonzentration bei der Analyse der Spektren akkurat genug angegeben wurde und somit die unterschiedlichen Signalamplituden der Proben nicht wegen unterschiedlicher Proteinkonzentrationen auftreten, dann ist aufgrund der Signalamplitude anzunehmen, dass Chl-mBoWSCP_{His} von allen Proben die stärkste Verdrehung seiner β -Stränge aufweist, gefolgt von Chl-BoWSCP_{His} und schließlich den beiden Apoproteinen.

Es ist anzunehmen, dass Chl-mBoWSCP_{His} von den hier untersuchten WSCP-Formen diejenige Form ist, welche dem nativen BoWSCP am meisten ähnelt und somit die gleiche Faltung aufweist – alle bisherigen experimentellen Daten deuten darauf hin (s. z.B. 4.1.7.3). Es wäre auf jeden Fall sinnvoll, auch das UV-CD-Spektrum von nativem BoWSCP zu messen, um festzustellen, ob es mit dem Spektrum von Chl-mBoWSCP_{His} vergleichbar ist. Dazu ist es jedoch notwendig, das native Blumenkohl-WSCP besser aufzureinigen. Bisher war es nicht möglich, vollkommen reines WSCP aus Blumenkohl-Blättern zu isolieren (s. 4.1.1). Ist also Chl-mBoWSCP_{His} nativem Chl-BoWSCP gleichzusetzen, so könnte neben der Gesamtamplitude des Spektrums eventuell auch die stärkere Ausprägung des CD-Signals bei 195 nm gegenüber dem Signal bei 201 nm, wie es bei Chl-mBoWSCP_{His} der Fall ist, als Indikator für die „native“ Faltung des WSCP-Komplexes gedeutet werden. Betrachtet man die Spektren in Abb. 4-19 unter diesem Gesichtspunkt, so weist Chl-BoWSCP_{His} nach

Chl-mBoWSCP_{his} das größte Verhältnis von CD₁₉₅/CD₂₀₁ auf – auch Apo-mBoWSCP_{his} zeigt ein vergleichbares Verhältnis dieser beiden CD-Signale. Lediglich beim unpigmentierten Vollängen-WSCP (Apo-BoWSCP_{his}) ist das Signal bei 195 nm viel geringer ausgeprägt als das Signal bei 201 nm. Das könnte so interpretiert werden, dass der C-Terminus, welcher beim Vollängenprotein noch vorhanden ist, die Gesamtfaltung des WSCP so stark beeinflusst, dass der Komplex ohne die stabilisierende Wirkung der Chlorophylle eine deutlich andere Gestalt annimmt. Unter dem Aspekt der „Verdrehung“ (s.o.) betrachtet, könnte man also vermuten, dass durch die Bindung der Chlorophylle das WSCP in seiner Konformation verdreht und in dieser Position „fixiert“ wird, wobei die hydrophoben Wechselwirkungen der Chlorophylle untereinander für die hohe Stabilität des Chl-WSCP-Komplexes verantwortlich sind (s. hierzu auch 5.1.1).

Unterschiedliche CD-Spektren bei Proben mit gleichen Gesamt-Sekundärstrukturanteilen können auch aufgrund einer abweichenden Anzahl und/oder Verteilung der Sekundärstrukturelemente auftreten (Pancoska *et al.*, 1996 & 1999). Beispielsweise könnten zwei Proteine jeweils zu 30% aus α -helikalen Bereichen und zu 70% aus β -Strängen und anderen Strukturen bestehen, jedoch unterschiedliche CD-Spektren aufweisen, da das eine Protein aus drei kurzen α -Helices und neun kurzen β -Strängen, das andere Protein jedoch aus einer langen α -Helix und 5 langen β -Strängen besteht. Da es sich bei den gemessenen WSCP-Proben aber um dasselbe Protein handelt, ist diese Erklärung für die Unterschiede in den Spektren unwahrscheinlich, da aufgrund der Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz der Proben anzunehmen ist, dass sich die ausgebildeten Sekundärstrukturen jeweils an der selben Stelle befinden und auch jeweils die gleiche Länge besitzen. Der einzige Unterschied in der Aminosäuresequenz der Proben ist, dass es sich einerseits um das Vollängenprotein handelt und andererseits um das C-terminal um 10 Aminosäuren verkürzte Protein. Da jedoch bei beiden Proteinen laut der Analyse der UV-CD-Spektren eine vergleichbare Anzahl an helikalen und Strang-Segmenten vorhanden ist (s. 8.5), ist anzunehmen, dass diese 10 C-terminalen Aminosäuren keine definierte Sekundärstruktur ausbilden.

Eine weitere Begründung für die Unterschiede zwischen den WSCP-CD-Spektren, trotz angeblich vergleichbaren Sekundärstrukturanteilen, könnte sein, dass eine bestimmte Sekundärstruktur nicht unbedingt immer ein eindeutiges/einzigartiges UV-CD-Spektrum aufweist, da das CD-Spektrum eines Chromophors von seiner Umgebung und somit auch von der Tertiärstruktur des Proteins beeinflusst wird (Jiskoot und Crommelin, 2005). Um nähere Auskünfte über die Tertiärstruktur der verschiedenen WSCP-Proben zu bekommen, müsste man im Wellenlängenbereich zwischen 250 und 350 nm CD-Spektren messen. In diesem UV-Bereich sind die Hauptchromophore die aromatischen Aminosäuren und die Disulfidgruppen (Sreerama *et al.*, 1999). Sie haben jedoch nur schwache CD-Signale, daher muss bei einer höheren Proteinkonzentration gemessen werden.

Abschließend lässt sich zu den UV-CD-Messungen also sagen, dass die Bindung von Chl anscheinend unerheblich für die Ausbildung der Sekundärstrukturmerkmale bei WSCP ist, da bereits das Apoprotein die gleichen relativen Sekundärstrukturanteile wie das pigmentierte Protein aufweist. Dies ist anders als bei LHCII – bei rekombinantem LHCIIb zeigte sich bei entsprechenden UV-CD-Messungen eindeutig, dass die Sekundärstrukturausbildung an die Pigmentbindung gekoppelt ist (Horn und Paulsen, 2002). Der C-Terminus von WSCP, der bei BoWSCP_{his} noch vorhanden ist, bei mBoWSCP_{his} jedoch fehlt, scheint ebenfalls keinen

signifikanten Einfluss auf die Ausbildung der sekundären Faltungsmerkmale des Proteins zu haben. Möglicherweise hat der C-Terminus jedoch einen Einfluss auf die Orientierung dieser Strukturen zueinander (s.o.). Unpigmentiertes WSCP nimmt vielleicht schon weitestgehend die native Konformation an, aber die Unterschiede in den Spektren zeigen, dass trotzdem die Faltung nicht exakt gleich ist wie die des pigmentierten Proteins. Die Chl-Bindung bewirkt wahrscheinlich eine Verdrehung der β -Stränge zueinander, und die hydrophoben Wechselwirkungen der Phytolschwänze der Chlorophylle führen vermutlich zu einer „Fixierung“ des Proteins in dieser Position. Dass die starken Unterschiede zwischen den CD-Spektren der pigmentierten und unpigmentierten Komplexe aufgrund intrinsischer CD-Signale der gebundenen Chlorophylle auftreten ist sehr unwahrscheinlich, da Chl im UV-Bereich nur ein sehr schwaches intrinsisches CD-Signal besitzt (Houssier und Sauer, 1970).

Die anfangs gestellte Frage, ob das Apoprotein bereits dieselbe Konformation wie das pigmentierte Protein einnimmt, muss demnach mit „nein“ beantwortet werden. Es bleibt also noch die Frage, ob die Stabilitätsunterschiede zwischen Chl- und Apo-WSCP alleine auf der Chl-Bindung beruhen, oder ob Apo-WSCP möglicherweise eine entsprechend hohe Stabilität zeigen würde, wenn es auch ohne die Chlorophylle die exakt gleiche Konformation annehmen würde wie Chl-WSCP.

5.1.3 Chl *a/b*-Affinität

Natives WSCP der Klasse IIA besitzt ein Chl *a/b*-Verhältnis von ca. 6-10 (Satoh *et al.*, 2001), welches deutlich höher ist als das Chl-*a/b*-Verhältnis in Blattextrakt und somit ein Indiz für eine höhere Affinität des Proteins gegenüber Chl *a* sein könnte. WSCP aus Blumenkohlblättern (BoWSCP), welches in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, gehört zu dieser WSCP-Klasse, und das hier isolierte native BoWSCP besaß auch ein Chl-*a/b*-Verhältnis von ungefähr 8. Das rekombinante BoWSCP_{His} wies jedoch nach Rekonstitution mittels Standardrekonstitutionsmethode (s. 3.1.8.1) immer ein Chl-*a/b*-Verhältnis auf, welches ungefähr dem Chl-*a/b*-Verhältnis der angebotenen Pigmentmischung entsprach (s. 4.1.5), und zeigte somit keine bevorzugte Bindung von Chl *a*. Während der Rekonstitution war das Protein über seinen N-terminalen Hexahistidylrest an einer Ni-Säule immobilisiert und wurde so mit einer Chl-Mischung inkubiert. Wurde das rekombinante BoWSCP_{His} jedoch in Lösung, d.h. nicht immobilisiert, mit einer Chl-*a/b*-Mischung inkubiert, enthielt das Rekonstitutionsprodukt ein Chl-*a/b*-Verhältnis, welches höher als das angebotene war und mit dem Chl-*a/b*-Verhältnis in nativem BoWSCP vergleichbar war. Dies deutet also doch auf eine höhere Chl-*a*-Affinität hin. Auch Satoh und Mitarbeiter konnten 1998 eine höhere Chl-*a*-Affinität beim MBP-WSCP-Fusionsprotein beobachten, welches in Lösung mit Chlorophyllen inkubiert wurde. Die Beobachtungen von Murata und Mitarbeitern (1971) deuten ebenfalls auf eine höhere Chl-*a*-Affinität des nativen Blumenkohl-WSCP hin – sie konnten das Apoprotein von nativem Blumenkohl-WSCP in Lösung mit Pigmenttotalextrakt (Chl *a/b* ~ 3) rückfalten, und das Rekonstitutionsprodukt zeigte wieder vergleichbare spektroskopische Eigenschaften wie das native pigmentierte WSCP, welches in diesem Fall ein Chl-*a/b*-Verhältnis von ungefähr 6 hatte.

Der Grund für diese vermeintlich widersprüchlichen Ergebnisse, dass das rekombinante BoWSCP_{His} einerseits bevorzugt Chl *a* bindet und andererseits doch nicht, liegt vermutlich in der gewählten Rekonstitutionsmethode. Bei der Standardrekonstitutionsmethode scheint

WSCP durch die Immobilisierung seines N-Terminus entweder die Fähigkeit zur Selektion zwischen Chl *a* und Chl *b* einzubüßen, oder seine Affinität für Chl *a* wird erniedrigt bzw. die Affinität für Chl *b* wird erhöht. Das Apoprotein ist bei der Rekonstitution auf der Ni-Säule in seiner Bewegungsfreiheit eingeschränkt und möglicherweise ist dabei auch die Konformation des Proteins verändert, was zu einer veränderten Ausrichtung einzelner Aminosäuren und/oder Proteindomänen zueinander führen würde und somit eine Änderung der Chl-Bindungseigenschaften bewirken könnte. Liegt das Apoprotein jedoch frei beweglich in Lösung vor, so kann es (weitgehend, s. 5.1.2) seine nativ gefaltete Form annehmen und verhält sich in seinen Chl-Bindungseigenschaften vergleichbar dem nativen WSCP.

Unter den in dieser Arbeit verwendeten Standardrekonstitutionsbedingungen besitzt BoWSCP_{His} demnach keine höhere Affinität für Chl *a* im Vergleich zu Chl *b*. Das freie, nicht immobilisierte WSCP hingegen, bindet bevorzugt Chl *a* (vgl. auch Gundlach, 2006 (Diplomarbeit)).

Ergebnisse aus transienten Absorptionsmessungen (Theiss *et al.*, 2007) sowie Femtosekunden-Fluoreszenzmessungen (Schmitt *et al.*, 2008) angeregter Chl-*a/b*-WSCP-Komplexe zeigten, dass die Komplexe weit weniger Chl-*b*-Homodimere enthalten, als bei Chl-*a/b*-haltigem WSCP statistisch erwartet. Bei WSCP mit einem Chl-*a/b*-Verhältnis von 4,2 bzw. 2,6 wären ca. 3,7% bzw. 7,7% Chl-*b*-Homodimere zu erwarten, bei angenommener gleicher Affinität für Chl *a* und *b* (Theiss *et al.*, 2007), wie es bei der Standardrekonstitutionsmethode der Fall zu sein scheint (s. oben). Die Messungen haben jedoch ergeben, dass der Anteil an Chl-*b*-Homodimeren in so rekonstituierten Proben unter 5% (bei WSCP mit Chl *a/b* = 4,2) bzw. unter 2% (bei WSCP mit Chl *a/b* = 2,6) liegt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass WSCP ungerne zwei Chl *b* bindet, wenn es genug Chl *a* gibt, dass jedes Tetramer mindestens ein Chl *a* enthalten kann. Es ist also anzunehmen, dass die Chlorophylle sukzessiv von WSCP gebunden werden, und dass bei der Bindung der Chlorophylle an das WSCP-Tetramer das zweite Chl vorzugsweise an ein WSCP bindet, welches bereits ein Chl *a* gebunden hat, nicht jedoch ein Chl *b*. Dies deutet auch darauf hin, dass Chl-*b*-Homodimere instabiler sind als Chl-*a*-Homodimere bzw. Chl-*a/b*-Heterodimere.

Die Stabilitätsuntersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit an rein Chl-*b*-haltigen WSCP-Komplexen durchgeführt wurden, sprechen jedoch dagegen. Die Rekonstitutionsausbeute ist bei der Herstellung von Chl-*b*-WSCP nicht merklich geringer als bei Chl-*a*- oder Chl-*a/b*-WSCP. Ist Chl *b* einmal gebunden, scheint seine Bindung durch WSCP genauso stark zu sein wie bei Chl *a*. Dies zeigte sich beispielsweise bei den Hitzestabilitätsuntersuchungen, bei denen Chl-*b*-WSCP die gleiche Hitzeresistenz besaß wie Chl-*a*-WSCP. Des Weiteren konnte weder bei Chl-*a*-WSCP noch bei Chl-*b*-WSCP während der nativen Gelelektrophorese – auch unter stringenten Bedingungen – ein Pigmentverlust beobachtet werden.

5.1.4 Energieübertragung zwischen den WSCP-gebundenen Chlorophyllen deutet auf unterschiedliche Chl-Bindungsmodi hin

Das CD-Spektrum von nativem sowie rekombinantem Chl-haltigem BoWSCP zeigt im langwelligen Bereich eine hohe Symmetrie, d.h. das positive und das negative CD-Signal weisen eine nahezu identische Fläche auf. Solch ein konservativer Verlauf im q_y -Bereich des

CD-Spektrums von Chl-Protein-Komplexen weist darauf hin, dass die gebundenen Pigmente excitonisch gekoppelt sind (Barzda *et al.*, 1994). Tatsächlich zeigten die im Rahmen einer Forschungskoooperation mit der TU Berlin durchgeführten spektroskopischen Messungen, dass Energieübertragung zwischen den BoWSCPHis-gebundenen Chlorophyllen stattfindet. Zeitaufgelöste Absorptionsspektren mit einer Auflösung im Femtosekundenbereich, die nach Laserpuls-Anregung gemessen wurden (durchgeführt von Dr. Christoph Theiss und Stefan Andree, Institut für Optik und Atomare Physik (IOAP), TU Berlin) zeigten nach Chl-*b*-Anregung eindeutig eine Übertragung der Anregungsenergie von Chl *b* auf Chl *a*. Bestätigt wurde dies auch durch die Ergebnisse der Tieftemperatur-Fluoreszenzspektren (gemessen von Franz-Josef Schmitt, Institut für Optik und Atomare Physik (IOAP), TU Berlin), bei denen nach Chl-*b*-Anregung von Chl-*a/b*-haltigen WSCP-Komplexen fast ausschließlich Chl-*a*-Fluoreszenz zu beobachten war.

Obwohl es sich beim rekombinanten BoWSCPHis um ein Homotetramer handelt, weisen diese spektroskopischen Messungen zusätzlich darauf hin, dass es verschiedene Chl-Bindungsstellen oder -modi gibt. Bereits 1997 postulierten Kamimura *et al.* bei nativem WSCP aus Rosenkohl (*B. oleracea* L. var. *gemmifera*) drei bis vier verschiedene Chl-Bindungsstellen bzw. -modi. Dabei fanden die Autoren nur ca. ein Chl-Molekül pro Tetramer – die Absorptionsspektren zeigten jedoch bis zu vier verschiedene spektrale Formen von Chl *a*. Die Gauss-Analyse der Grundzustandsabsorptionsspektren von Chl-*a/b*-haltigen BoWSCPHis-Komplexen lieferte ebenfalls mehrere spektrale Chl-Formen, was darauf hindeutet, dass auch bei diesem WSCP das Chl-Molekül auf unterschiedliche Weisen gebunden werden kann (Theiss *et al.*, 2007). Weiterhin wird diese These unterstützt durch die transienten Absorptionsänderungen, die an Chl-*a/b*-WSCP sowie an Chl-*b*-WSCP nach Laserpuls-Anregung der Chlorophylle gemessen wurden. Dabei traten Kinetiken mit unterschiedlichen Zeitkonstanten auf – es gab eine schnelle Kinetik mit einer Zeitkonstante von 400 fs und eine langsame Kinetik mit einer Zeitkonstante von ca. 7 ps, was als Energieübertragung zwischen stark gekoppelten bzw. schwach gekoppelten Chlorophyllen interpretiert wurde (Theiss *et al.*, 2007). Zudem konnte bei rein Chl-*b*-haltigem WSCP eine graduelle Rotverschiebung des Maximums der Chl-*b*-Ausbleichung nach der Anregung beobachtet werden (Theiss, 2006), was auf unterschiedlich gebundene Chl-*b*-Moleküle innerhalb der WSCP-Komplexe hinweist.

Unterschiede in den spektralen Eigenschaften der WSCP-gebundenen Chlorophylle rühren höchstwahrscheinlich von lokalen Differenzen in der Proteinumgebung des jeweiligen Pigments her. Da es sich bei WSCP, vor allem natürlich bei dem hier verwendeten rekombinanten Protein, um ein Homotetramer handelt, mit nur einer Chl-Bindungsstelle pro Monomer-Untereinheit, sollten die gebundenen Pigmente eigentlich identische Proteinumgebungen besitzen. Dass es offenbar doch Unterschiede gibt, kann einerseits bedeuten, dass die in jedem Monomer vorhandene Chl-Bindungsstelle Flexibilität hinsichtlich der Orientierung des von ihr gebundenen Chl-Moleküls besitzt. Eine weitere mögliche Erklärung für lokal unterschiedliche Proteinumgebungen der Chlorophylle ist eine unterschiedliche Verzerrung der gesamten Proteinstruktur, je nachdem, an welche zwei Untereinheiten die beiden Chl-Moleküle gebunden sind, da bei nur zwei Chlorophyllen pro Tetramer (s. 4.1.4) immer zwei Bindungsstellen unbesetzt sind, wodurch ein vermutlich flexibler Hohlraum im Inneren des Proteins entsteht.

5.1.5 Stabilität und mögliche technische Anwendungen des WSCP

Natives und rekombinantes Blumenkohl-WSCP stellte sich bei den hier durchgeführten Stabilitätsexperimenten nicht nur als äußerst thermostabil heraus, indem es bis zu einer Stunde Inkubation bei 95°C überstand, sondern auch noch als pH-stabil über einen weiten pH-Bereich (pH 0-10). Auch rekombinantes *Arabidopsis*-WSCP erwies sich als vergleichbar thermostabil (die pH-Stabilität wurde nicht überprüft). Diese Stabilität zeigen jedoch nur die mit Chl pigmentierten WSCP-Komplexe – sowohl das unpigmentierte Protein als auch das mit Chlid pigmentierte Protein denaturieren bei Temperaturen über 60°C (vgl. 4.1.7.1). Die hohe Stabilität der Komplexe wird demnach vorwiegend durch die Bindung von Chl-Molekülen bedingt (s. hierzu auch 5.1.2) – wahrscheinlich aufgrund starker hydrophober Wechselwirkungen ihrer Phytolschwänze miteinander, die z.B. bei WSCP aus *Lepidium virginicum* dicht zueinander in Kontakt stehen im Zentrum des Pigment-Protein-Komplexes (Horigome *et al.*, 2007).

Die gebundenen Chlorophylle bleiben vor schädlichen Auswirkungen der Stressbehandlung geschützt. Der Grund hierfür liegt vermutlich in der sehr kompakten Faltung des Proteins, die bewirkt, dass sich die Chlorophylle in einer sehr engen hydrophoben Tasche im Zentrum des WSCP-Tetramers befinden, in der äußere Einflüsse, wie z.B. molekularer Sauerstoff oder Lösungsmittel, keinen Zugang zu den Chl-Molekülen haben (Horigome *et al.*, 2007). Das „Verstecken“ der Chlorophylle auf diese Weise ist wahrscheinlich auch der Grund dafür, dass sie durch WSCP vor Photooxidation geschützt werden, wie von Schmidt *et al.* (2003) beobachtet. Die von Schmitt *et al.* (2008) durchgeführten zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen an Chl-WSCP unterstützen diese Annahme ebenfalls. Die Autoren konnten ausschließen, dass die in Schmidt *et al.* (2003) beobachtete, merklich geringere $^1\text{O}_2$ -Produktion durch WSCP-gebundenes Chl im Vergleich zu freiem Chl, auf direktes Quenchen von $^1\text{Chl}^*$ durch die Proteinmatrix zurückzuführen ist. Sie beobachteten, dass die Lebenszeiten von WSCP-gebundenem $^1\text{Chl}^*$ und monomerem, freiem $^1\text{Chl}^*$ praktisch identisch sind, und somit auch die Wahrscheinlichkeit der Bildung des gefährlichen $^3\text{Chl}^*$ bei WSCP-gebundenem Chl nicht herabgesetzt ist. Daher scheint alleine die kompakte Faltung des Proteins den Kontakt zwischen molekularem Sauerstoff und den gebundenen Chlorophyllen zu unterbinden und die Pigmente so vor Photooxidation zu schützen. Die enorme Hitzestabilität von Chl-WSCP macht deutlich, dass selbst eine sehr hohe kinetische Energie nicht ausreicht, um die kompakte Faltung des Pigment-Protein-Komplexes anzugreifen.

Die Tatsache, dass WSCP so ein stabiles Protein ist und dazu auch noch Chlorophylle bindet, die durch das Protein vor schädlichen äußeren Einflüssen weitgehend geschützt sind und zwischen denen Energieübertragung stattfindet (s. 5.1.4), macht WSCP zu einem interessanten Einsatzobjekt beispielsweise für technische Zwecke. Eine Möglichkeit wäre der Einsatz von WSCP in „Bio-Solarzellen“, da das Protein die dabei entstehende Hitze gut überstehen könnte und die Chlorophylle vor schädigenden Wirkungen der Lichteinstrahlung weitgehend geschützt wären. Bisherige Versuche, solche „Bio-Solarzellen“ mit LHCII zu konstruieren, scheiterten hauptsächlich an der geringen Photostabilität des LHCII (Lion, 2005). Zudem ist LHCII nicht wasserlöslich, was seine Einsatzmöglichkeiten einschränkt. Ein großer Nachteil des WSCP für den Einsatz in lichtsammelnden Systemen liegt jedoch auf der Hand: das geringe Chl/Protein-Verhältnis. Während im LHCII 14 Chlorophylle pro

Monomer gebunden werden, sind es bei WSCP nur 0,5-1. Der in dieser Arbeit durchgeführte Versuch, alle vier Chl-Bindungsstellen in BoWSCP_{His} abzusättigen (s. 4.1.8), lieferte uneindeutige Ergebnisse und war vermutlich nicht erfolgreich. Um dieses Problem anzugehen könnten Donor- bzw. Akzeptorfarbstoffe mit hoher Quantenausbeute an WSCP gekoppelt werden, um die Nutzung der einstrahlenden Lichtenergie zu maximieren. Aus den Strukturdaten für LvWSCP (Horigome *et al.*, 2007) lassen sich die Entfernungen zwischen den Chl-Molekülen (gemessen vom zentralen Mg-Atom) und verschiedenen Stellen der Proteinperipherie, die als potentielle Anknüpfstellen für Donor-/Akzeptorfarbstoffe dienen könnten, ausmessen. Der größte Abstand zwischen einem Chl-Molekül und der Peripherie seiner zugehörigen Proteinuntereinheit beträgt ca. 4 nm und liegt somit noch deutlich innerhalb des für Förster-Energietransfer benötigten Minimalabstandes von ≤ 10 nm (Wu und Brand, 1994). Selbst zwischen einem Chl-Molekül und der Peripherie der davon am weitesten entfernten Proteinuntereinheit besteht ein Abstand von höchstens 6 nm. Eine Kopplung der WSCP-gebundenen Chlorophylle mit entsprechend geeigneten Chromophoren, um eine maximale Nutzung der eingestrahnten Lichtenergie zu erreichen, ist demnach durchaus denkbar, solange die weiteren Kriterien für Förster-Energietransfer dabei erfüllt werden (Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors, sowie eine geeignete Orientierung der Übergangsdipolmomente des Energiedonors und -akzeptors zueinander).

Eine andere technische Einsatzmöglichkeit für WSCP in der Nanotechnologie wäre in einem Hybridkomplex zusammen mit Nanokristallen. Hier könnte WSCP, über seinen Hexahistidylrest an die Nanokristalle gekoppelt, unter geeigneten Bedingungen die Nanokristalle zu einer oligomeren Anordnung zwingen (bei der Tetramerisierung von WSCP) bzw. wieder zerfallen lassen (bei der Di- oder Monomerisierung von WSCP) und somit als eine Art „Schalter“ fungieren. Dies setzt natürlich eine steuerbare reversible Änderung des Oligomerisierungszustandes von WSCP voraus. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, solch eine Reversibilität durch den Austausch von Chl und Chlid an WSCP, bzw. durch die Hydrolyse des gebundenen Chlorophylls zu Chlid mit dem Enzym Chlorophyllase zu erreichen. Unter nativen Bedingungen nimmt Chlid-WSCP eine tetramere Form an, aber bei erhöhter Stringenz zerfallen diese Komplexe zu Dimeren oder Monomeren (s. 4.1.7.3 und 5.1.1). Der Austausch von Chl gegen Chlid und umgekehrt funktionierte nur in eine Richtung – es konnte lediglich WSCP-gebundenes Chlid gegen Chl ausgetauscht werden. Somit wäre es zum jetzigen Zeitpunkt nur möglich, durch einen solchen Pigmenttausch WSCP-gekoppelte Nanokristalle von einem monomeren oder dimeren Zustand in einen höher oligomeren Zustand zu bringen, aber nicht umgekehrt. Dieses Ergebnis überrascht nicht, da Chl nachweislich so stark von WSCP gebunden wird, dass es nicht mit Lösungsmitteln extrahiert werden kann, ohne den Pigment-Protein-Komplex vorher mittels Detergens-einwirkung plus Hitzebehandlung zerstört zu haben (s. 3.1.9.1 und 4.1.4). Chl wird im Zentrum des kompakt gefalteten Proteins vor äußeren Einflüssen geschützt (Horigome *et al.*, 2007) und selbst eine extreme Hitzebehandlung kann diese kompakte Faltung nicht beeinflussen (s. 4.1.7.1). Wieso sollte sich also das Protein „öffnen“ und bereits gebundenes Chl gegen Chlid austauschen? Aus diesem Grund konnte vermutlich auch keine Hydrolyse des WSCP-gebundenen Chlorophylls durch die Chlorophyllase stattfinden – das Pigment ist für das Enzym vermutlich einfach nicht zugänglich.

Um eine reversible „Schalterfunktion“ des WSCP zu erreichen, müsste man einen Weg finden, aus tetramerem Chl-WSCP das Pigment zu extrahieren und aus seiner Umgebung zu entfernen, ohne die Komplexe komplett zu denaturieren. Dann würden diese Komplexe – bei geeigneter Stringenz – zu Monomeren zerfallen. Bei erneuter Zugabe von Chl würden sie wieder Tetramersieren.

Neben den technischen Einsatzmöglichkeiten, ist WSCP aufgrund seines einfachen Aufbaus und seiner geringen Chl-Besetzung hervorragend geeignet, um Chl-Chl- und Chl-Protein-Interaktionen in einem vereinfachten System zu untersuchen. Dabei haben seine enorme Stabilität und die Langlebigkeit seiner Chlorophylle den weiteren Vorteil, dass ein und dieselbe Probe jahrelang aufbewahrt und untersucht werden kann.

5.1.6 Rekombinantes WSCP aus *Arabidopsis thaliana* zeigt ähnliche biochemische Eigenschaften wie rekombinantes BoWSCP, aber auch einige Unterschiede

Im Rahmen der Diplomarbeit von Andrea Weil (2007) ist es unter Anleitung der Autorin gelungen, WSCP aus *Arabidopsis thaliana* (AtWSCP) mit einem Hexahistidylrest für die spätere Aufreinigung an einer Ni-Sepharose-Matrix zu versehen, das Protein zu klonieren und es rekombinant zu exprimieren. Es zeigte sich allerdings dabei, dass das rekombinante AtWSCP_{His} weitaus weniger effizient exprimiert wird als das entsprechende rekombinante Protein aus Blumenkohl, BoWSCP_{His} bzw. die C-terminal verkürzte Version mBoWSCP_{His}. Auch die Rekonstitutions- und Aufreinigungsausbeute ist bei AtWSCP_{His} wesentlich geringer (< 10%), sodass man ca. 13 mg Protein einsetzen muss, um etwa 1 mg aufgereinigtes Protein zu erhalten (Weil, 2007 (Diplomarbeit)). Der vermutete Grund hierfür ist die Tatsache, dass bei AtWSCP_{His} der Hexahistidylrest am C-Terminus lokalisiert ist, während er bei BoWSCP_{His} sowie mBoWSCP_{His} am N-Terminus liegt. Es wäre also sinnvoll, einen neuen Klon von AtWSCP_{His} herzustellen, bei dem sich der Hexahistidylrest am N-Terminus befindet, da dies mit relativ wenig Aufwand verbunden ist und die Chancen gut stehen, dass dadurch die Expressions- und Rekonstitutionsausbeute bedeutend erhöht werden können.

Trotz der Schwierigkeiten mit AtWSCP_{His} ließ sich das Protein, wie BoWSCP_{His}, mit Chl auf einer Ni-Säule rekonstituieren. Chlid, welches alternativ zu Chl von BoWSCP_{His} gebunden werden kann (Schmidt *et al.*, 2003; Gundlach, 2006 (Diplomarbeit), sowie eigene Ergebnisse (s. 4.1.7.3)) wurde ebenfalls von AtWSCP_{His} gebunden. Die rekonstituierten Komplexe erwiesen sich als vergleichbar thermostabil zu den entsprechenden BoWSCP_{His}-Komplexen – die mit Chl pigmentierten AtWSCP_{His}-Komplexe sind hitzestabil bis mindestens 100°C, die Chlid-Komplexe hingegen nicht. Auch die Beobachtung, dass während der Gelelektrophorese mit Deriphat-Laufpuffer die Chlid-AtWSCP_{His}-Komplexe teilweise ihr Pigment verlieren, entspricht dem Verhalten von Chlid-BoWSCP_{His}. Auch hier ist die Chlid-Bindung an WSCP schwächer als die Chl-Bindung (s. auch 4.1.7.3). Des Weiteren zeigte AtWSCP_{His} eine dem BoWSCP_{His} ähnliche – leicht höhere – Mobilität in nativer PAGE, allerdings nur, wenn Deriphat, ein zwitterionisches Detergens, im Laufpuffer enthalten war. Ganz ohne Detergens ist AtWSCP_{His} kaum während der Elektrophorese im Gel gewandert, was entweder darauf zurückzuführen ist, dass sich das Protein unter diesen Bedingungen zu unspezifischen Aggregaten zusammenlagert, oder darauf, dass es möglicherweise eine

wesentlich weniger negative Nettoladung als BoWSCPhis besitzt. Bei AtWSCPhis ist das Verhältnis von negativ geladenen zu positiv geladenen Aminosäureresten kleiner als bei BoWSCPhis und mBoWSCPhis.

Trotz der großen Ähnlichkeiten, die AtWSCPhis auf den ersten Blick mit BoWSCPhis aufweist, gibt es doch einige Unterschiede zwischen den Proteinen. Obwohl AtWSCPhis eine mit BoWSCPhis vergleichbare Hitzestabilität zeigt, ist seine Stabilität bei der Gelelektrophorese geringer. Ein Großteil der AtWSCPhis-Komplexe zerfiel während der Gelelektrophorese mit detergenshaltigem (Deriphat-) Puffer zu kleineren Einheiten, bei denen es sich um Monomere oder Dimere handelt (s. Abb. 4-23). Diese Komplexe besitzen zwar dieselbe PAGE-Mobilität wie die BoWSCPhis-Monomere, aber da die pigmentierten AtWSCPhis-Komplexe unter diesen Elektrophoresebedingungen generell eine etwas höhere PAGE-Mobilität aufweisen als die entsprechenden BoWSCPhis-Komplexe, handelt es sich eher um Dimere. Dafür spricht auch die Tatsache, dass diese Einheiten ihre Pigmentierung beibehielten, was dem Verhalten der Chl-BoWSCPhis-Dimere unter denselben Bedingungen entspricht (s. 4.1.7.3).

Ein weiterer deutlicher Unterschied zu BoWSCPhis ist, dass das Chl/Protein-Verhältnis bei Chl-AtWSCPhis reproduzierbar nur bei ca. 0,3 liegt, was deutlich niedriger ist als bei Blumenkohl-WSCP, wo dieser Wert sowohl beim nativen als auch beim rekombinanten Protein ca. 0,5 beträgt (Hughes *et al.*, 2006; Satoh *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 2003; sowie eigene Ergebnisse (s. 4.1.4)). Bei einem Chl/Protein-Verhältnis von nur 0,3 muss man annehmen, dass AtWSCPhis entweder als Trimer vorkommt, mit nur einem Chl pro Trimer, oder es ist wie BoWSCPhis und LvWSCPhis zwar ein Tetramer, es handelt sich aber um eine gemischte Population, bei der z.B. einige Tetramere nur ein einziges Chl binden und einige zwei Chlorophylle binden.

Die erste Annahme, AtWSCPhis könne ein Trimer sein, findet Unterstützung im Laufverhalten der Komplexe bei nativer PAGE mit Deriphat-Laufpuffer (s. Abb. 4-23), wo sie eine höhere PAGE-Mobilität aufweisen als die entsprechend pigmentierten BoWSCPhis-Tetramere – sie laufen ungefähr dort, wo man Trimere erwarten würde. Dies muss aber nicht zwingend einen geringeren Oligomerisierungsgrad bedeuten, sondern die PAGE-Mobilität hängt ebenfalls von der Nettoladung der Komplexe ab, und wenn diese bei AtWSCPhis negativer ist als bei BoWSCPhis, wäre das auch eine Erklärung für die höhere PAGE-Mobilität. Zudem besitzt AtWSCPhis ein etwas geringeres Molekulargewicht – 21,8 kDa pro Monomer, im Vergleich zu BoWSCPhis (22,9 kDa).

Die zweite Annahme, es handele sich um Tetramere mit unterschiedlich viel gebundenen Chl-Molekülen, wäre ein ungewöhnliches Verhalten des Proteins und würde dafür sprechen, dass die Chl-Bindungsaffinität nicht so hoch ist wie bei BoWSCPhis. Es könnte auch bedeuten, dass die Chlorophylle nur unspezifisch gebunden werden. Um daher zu überprüfen, ob es sich bei der Chl-Bindung an AtWSCPhis um eine spezifische Bindung handelt, wurden dem Protein auch Chlid, Pheophytin und Pheophorbid angeboten. Es wurde erwartet, dass im Falle einer spezifischen Bindung das Protein zwar Chlid binden kann, nicht jedoch die anderen beiden Pigmente. Bei WSCP aus Blumenkohl ist für die Pigmentbindung das zentrale Metallion im Porphyrinring ein essentielles Bindungskriterium – neben Mg^{2+} wird

auch Zn^{2+} akzeptiert, aber es werden keine Pigmente gebunden, die kein zentrales Metallion in ihrem Porphyrinring besitzen, wie z.B. Pheophytin (Schmidt *et al.*, 2003).

Es stellte sich interessanterweise heraus, dass AtWSCPhis tatsächlich Pheophytin binden kann. Pheophorbid wurde hingegen nur in Spuren gebunden bzw. es ist wahrscheinlicher, dass das freie Pigment bei der Rekonstitution nicht ausreichend entfernt wurde und somit als Verunreinigung im Rekonstitutionsprodukt enthalten war. Bei der Pheo-AtWSCPhis-Probe, hingegen, zeigte die HPLC-Analyse der aus den Komplexen extrahierten Pigmente, dass ca. 50% des Gesamtpigments aus Pheo *a* und Pheo *b* zusammengesetzt war. Die restlichen 50% waren ein unbekanntes Chl-Derivat, mit Absorptionsmaxima (in Aceton) bei 444 und 635 nm, bei dem es sich wahrscheinlich um eine oxidierte Form von Chl *b* handelt. Erste Vermutungen, es könne sich hierbei um Ni^{2+} -Pheophytin handeln, bei dem das Ni^{2+} von der Ni-Sepharose stammt, an der das Protein über seinen Hexahistidylrest während der Rekonstitution immobilisiert wird, haben sich nicht bestätigt. Die Absorptionsmaxima von Ni^{2+} -Pheophytin liegen bei ca. 418 und 648 nm (Eisen, 1991 (Diplomarbeit)) und stimmen somit nicht mit den entsprechenden Maxima des hier gefundenen Derivats überein.

AtWSCPhis besitzt gegenüber diesem Chl-Derivat eine deutlich höhere Affinität als zu den beiden Pheophytinen, da das Derivat als Verunreinigung im Rekonstitutionsansatz in kaum detektierbaren Mengen vorhanden war (ca. 0,3%), jedoch offenbar selektiv von AtWSCPhis gebunden wurde, bis es etwa die Hälfte des gebundenen Pigments konstituierte. Das mit diesem Chl-Derivat sowie Pheophytin pigmentierte AtWSCPhis ist erstaunlicherweise genauso thermostabil wie Chl-AtWSCPhis (s. Abb. 4-21). Es wurde jedoch nicht festgestellt, ob nach der Hitzebehandlung noch Pheophytin gebunden vorlag, oder ob nur das Chl-Derivat, aufgrund der starken Bindung zwischen seinem Mg^{2+} -Ion und dem Proteinerückgrat (vgl. 5.1.6.1 und Horigome *et al.*, 2007), noch in den Komplexen vorhanden war. Dies ist zu vermuten, da bereits die bevorzugte Bindung des Chl-Derivats gegenüber Pheophytin zeigt, dass Pheophytin weniger stabil von AtWSCPhis gebunden wird.

5.1.6.1 Rückschlüsse aus den Pigmentbindungseigenschaften von AtWSCP auf den Pigmentbindungsmodus von At- und BoWSCP

Die Bindung von Pheophytin durch AtWSCP ist ein sehr überraschendes Ergebnis und wirft neue Fragen über den Pigmentbindungsmodus von WSCP auf. Horigome *et al.* (2007) haben die Kristallstruktur von LvWSCP bei 2 Å aufgelöst und festgestellt, dass in jeder Proteinuntereinheit des Komplexes der Aminosäurerest Pro36 über seine Carbonylgruppe eine koordinative Bindung mit dem Mg^{2+} -Ion des jeweiligen Chl-Moleküls eingeht. Des Weiteren haben die Autoren festgestellt, dass die Chl-Moleküle sehr eng gepackt in einem durch alle vier LvWSCP-Untereinheiten gebildeten hydrophoben Hohlraum vorliegen. Trotz der Enge und der Hydrophobizität des Hohlraumes ist pro Chl-Molekül ein Wassermolekül anwesend, welches über Wasserstoffbrückenbindungen die Interaktion zwischen dem Chl und dem Protein stabilisiert. In der nachfolgenden Abbildung ist die Bindung zwischen einem Chl-Molekül und den WSCP-Untereinheiten dargestellt (aus Horigome *et al.*, 2007). Außerdem ist ein Alignment der Aminosäuresequenzen von AtWSCP, BoWSCP und LvWSCP abgebildet, bei dem die bei LvWSCP an der Chl-Bindung beteiligten Aminosäuren farblich hervorgehoben sind.

```

AtWSCP      1  -----MKNPSVTSISFLIILLFAATICTHGNEPVKDTAGNPLNTREQYFIQPVKTE
BoWSCP1    1  -----MKTEFLVTLILLAAAVCTHGREQVKDSNGNPVIRGAKYFIQPAKS-
LvWSCP     1  MKNNKPSISESFSISLEFLLVSAVAVSAINDEE PVKDTNGNPLKIE'RYFIQPASDN
consensus  1  . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .
# nach Horigome et al. (2007)                1   5   10  15  20  25

AtWSCP      50  SKNGGGLVPPAATVLPFCPLGITQTLTLLPYQPLPVSFVLALGVG--STVMTSSAV
BoWSCP1    45  --NGGGLVPAAINILPFCPLGITQTLTLLPYQPLPVSFGYEPVIVGTDYTYTSTTI
LvWSCP     56  --NGGGLVPPANVDLSHLCPGLIVRTSLPYQPLPVTISTPSSSEG--NDVLTNTNI
consensus  56  ***** . . . . . ***** . * ***** . . . . . * . . . . .
                                30  35  40  45  50  55  60  65  70  75  80

AtWSCP     103  NIEFKSNITWPECKEFSKFWVDDSSAPKEPSILIGGKMGDRNSSFKIEKAGEGA
BoWSCP1    98  NIEFRSEIWPVCNELSKLWAVDVSSAAKEPAIIIGGERTAPNSLFKIEEATG--
LvWSCP     108  AITTEDAPLWLCP--SSKTWTVVSSS---EEKYIITGGDPKSGESFFRIEKYGN--
consensus  111  . * . * . * . . . . . * . * . * . * . . . . . * . * . * . * . . . . .
                                85  90  95  100  105  110  115  120  125

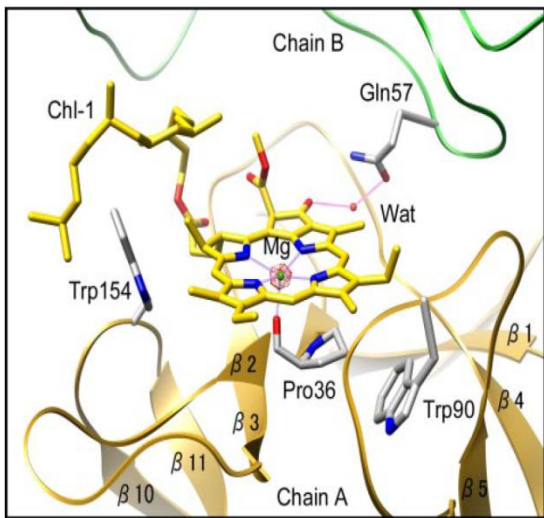
AtWSCP     158  RANVYKLTTEYG---TVGALPGVWLSAPQLITKDTAKTLLVKFKKVVDDATAT
BoWSCP1    151  -AHTYKLTSSG---TVGTLPGEWLGAPQLIATNDDAKTLLVKFKKVVDDATKA
LvWSCP     156  GKNTYKLVRYDNGEGKSVGSTKSLWG--PALVINDDDSDENAFPIKRFREVDTSK
consensus  166  . . . * . . . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .
                                130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180

AtWSCP     209  SNLYFPG-----
BoWSCP1    201  TTSTSRVEKLGLRMFPEY
LvWSCP     209  GSVFKKSS---LRMFPEV
consensus  221  . . . . . * . . . . .
                                185 190 195

```

Abb. 5-1: Alignment von AtWSCP mit BoWSCP und LvWSCP.

Das Alignment der Volllänge-sequenzen (mit Präsequenz) der drei WSCPs wurde mit ClustalW und Boxshade 3.21 durchgeführt. **Oben:** Alignment, die Nummerierung (blau) entspricht der Nummerierung der LvWSCP-Sequenz nach Horigome et al., 2007. **roter Kasten:** Prolinrest, der bei LvWSCP die koordinative Bindung mit Mg²⁺ des Chl-Moleküls eingeht; **gelber Kasten:** Glutaminrest, der bei LvWSCP über ein Wassermolekül eine H-Brückenbindung mit dem Chl-Molekül der benachbarten WSCP-Untereinheit eingeht; **grüne Kästen:** Tryptophanreste, die über Van-der-Waals-Kräfte mit dem Chl-Molekül interagieren. **blaue Balken:** Proteindomänen, aus denen die hydrophobe Chl-Bindungstasche gebildet wird. **Unten:** Darstellung der Bindung zwischen einem Chl-Molekül und den LvWSCP-Untereinheiten A und B; aus Horigome et al., 2007.



Anhand des Alignments kann man deutlich erkennen, dass die bei LvWSCP für die Chl-Bindung verantwortlichen Aminosäuren bei allen drei WSCP-Arten konserviert sind. Die ersten beiden, Pro36 und Gln57 (Nummerierung von LvWSCP) liegen zusätzlich mitten in hochkonservierten Bereichen. Aufgrund dieser Tatsache ist es sehr wahrscheinlich, dass bei AtWSCP und BoWSCP die gleichen Aminosäuren maßgeblich an der Chl-Bindung beteiligt sind. Wenn dies so ist, dann stellt sich die Frage, wieso AtWSCP Pheophytin binden kann – wenn auch schwächer als Chl – und BoWSCP dies nicht kann. Wenn die koordinative Bindung des Mg²⁺-Ions mit dem Proteinrückgrat zwar die stärkste Bindung zwischen dem Chl-Molekül und WSCP darstellt, jedoch nicht essentiell ist für das Zustandekommen der

Chl-Bindung, dann wäre nämlich zu erwarten, dass auch BoWSCP Pheophytin binden kann. Ein Bindungsversuch mit Pheophytin sollte wiederholt werden unter denselben Bedingungen wie der in dieser Arbeit mit AtWSCPHis durchgeführte Versuch. Die Aussage von Schmidt *et al.* (2003), dass BoWSCP kein Pheophytin binden kann, stammt von Rekonstitutionsversuchen mit IBs von BoWSCPHis. In dieser Arbeit wurden jedoch keine IBs, sondern ausnahmslos das als lösliches Protein exprimierte BoWSCPHis für Rekonstitutionen verwendet, da die IBs eine sehr niedrige Rekonstitutionsausbeute zeigten und es einige Hinweise darauf gab, dass sie nicht richtig gefaltet waren (vgl. 4.1.2.1). Möglicherweise würde man mit dem löslichen Protein das gleiche Ergebnis erzielen wie hier mit AtWSCPHis, und somit eine schwache Bindung von Pheophytin durch BoWSCPHis beobachten.

Weiterhin ist unklar, auf welche Art die Chlorophylle in BoWSCP gebunden vorliegen – man kann nur anhand der LvWSCP-Struktur entsprechend spekulieren. Die tetramere Struktur von LvWSCP wird von Horigome *et al.* (2007) auch als „Dimer aus Dimeren“ beschrieben. Jedes der beiden Dimere bindet zwei Chl-Moleküle (ein Chl pro Monomer-Untereinheit), welche selbst ein Dimer bilden, in dem die Chlorophylle in einer sogenannten „*open sandwich*“ Orientierung zueinander vorliegen, was man sich in etwa wie ein aufgeschlagenes Buch vorstellen kann, bei dem der Winkel zwischen den beiden Buchhälften knapp 30° beträgt. Das offene Ende des Chl-Dimers liegt bei C-2 des Porphyrinrings, das geschlossene Ende bei C-13¹ (Nummerierung der C-Atome nach Moss, 1988). Die Phytolschwänze sind eingefaltet zwischen den beiden Flächen der Porphyrinringe und ragen aus dem offenen Ende des Chl-Dimers heraus. Diese Daten basieren auf direkten Messungen von LvWSCP-Kristallen.

Im Vergleich dazu gibt es für BoWSCP bezüglich der Orientierung der Chlorophylle zueinander nur Daten aus theoretischen Berechnungen, die auf indirekten Messungen (z.B. Vis-CD-Spektren der Chl-WSCP-Komplexe) basieren (Hughes *et al.*, 2006; Renger *et al.*, 2007 und 2009). Im Gegensatz zu LvWSCP enthält BoWSCP im Schnitt nur zwei Chlorophylle pro Tetramer (Hughes *et al.*, 2006; Satoh *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 2003; sowie eigene Ergebnisse (s. 4.1.4)). Aus den Berechnungen für Chl-BoWSCP wurde von den Autoren ebenfalls eine „*open sandwich*“ Orientierung der Chlorophylle zueinander postuliert – bei Hughes *et al.* (2006) mit einem Winkel von ca. 60°, bei Renger *et al.* (2007) mit einem Winkel von ca. 30° zwischen den Porphyrinringen der Chl-Moleküle, wobei der zweite Wert gut mit den Daten von Horigome *et al.* (2007) übereinstimmt. Bei BoWSCP wird das Modell des Chl-Dimers von den Autoren mit dem geschlossenen Ende bei C-2 und dem offenen Ende bei C-13¹ dargestellt, demnach genau entgegengesetzt zu den Chlorophyllen in LvWSCP. Unklar ist hierbei jedoch wie sich die Phytolschwänze verhalten – ob sie sich genauso wie bei LvWSCP in das Chl-Dimer „hineinfalten“ oder ob sie in gestreckter Form das offene Ende des Chl-Dimers verlängern. Um die starken hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Phytolschwänzen zu entfalten, die vermutlich für die extrem hohe Stabilität von Chl-WSCP verantwortlich sind (vgl. 5.1.2 und 5.1.5), müssen die Phytolschwänze engen Kontakt zueinander haben.

5.2 Versuche zur biologischen Funktion von WSCP

5.2.1 *Arabidopsis*-WSCP-“knock-out“-Pflanzen zeigen keinen Phänotyp

In dieser Arbeit wurden homozygote WSCP-“knock-out“-Pflanzen (Δ WSCP) von *Arabidopsis thaliana*, vom Columbia (Col) Ecotyp, intensiv untersucht. Der Gen-“knock-out“ wurde sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene bestätigt. Diese Pflanzen zeigen gegenüber den Wildtyp-Pflanzen keinerlei Auffälligkeiten unter normalen Anzuchtbedingungen. Weder das Ergrünungs- noch das Wachstumsverhalten unterscheiden sich vom Wildtyp. Auch Stressversuche mit den Δ WSCP-Pflanzen, bei denen sowohl Keimlinge als auch adulte und senescente Pflanzen untersucht wurden, brachten keinen Phänotyp zum Vorschein. Lediglich bei Stressversuchen mit alternierender Starklicht/Schwachlicht-Phase konnte nach 96 Stunden eine Pigmentauffälligkeit im Chl-*a/b*-Verhältnis der Mutanten festgestellt werden, die allerdings bei den Kontrollpflanzen ebenfalls – wenn auch schwächer ausgeprägt – zu genau diesem Zeitpunkt auftrat (s. 4.2.2.3). Wenn es sich hierbei tatsächlich um einen Phänotyp der Mutante handelt, dann ist dieser somit nicht starklichtabhängig. Da jedoch nach 120 Stunden Versuchsdauer das Chl-*a/b*-Verhältnis von WT und Δ WSCP bei den Kontrollpflanzen plötzlich wieder identisch ausfiel, und bei den Starklicht-behandelten Pflanzen dies nach 144 Stunden ebenfalls der Fall war (Daten nicht gezeigt), könnte es sich bei der kurzzeitigen Pigmentauffälligkeit auch um einen Artefakt der Pigmentextraktion handeln. Auch die Tatsache, dass WSCP in *Arabidopsis* nicht (zumindest nicht in detektierbaren Mengen) in den Blättern exprimiert wird (s. weiter unten), macht es unwahrscheinlich, dass es sich bei der beobachteten starken Schwankung im Chl-*a/b*-Verhältnis tatsächlich um einen Phänotyp der Mutante handelt.

Falls WSCP tatsächlich als Transporter für Chl und seine Vorstufen bei der Chl-Biogenese und/oder der Zusammenstellung der Lichtsammelkomplexe dient, wie z.B. von Reinbothe *et al.* (2004a) und Satoh *et al.* (1998) postuliert wurde, wäre zu erwarten, dass die „knock-out“-Pflanzen, denen dieses Protein fehlt, langsamer ergrünen und wachsen als die Wildtyp-Pflanzen. Eine Erklärung dafür, dass dies nicht der Fall ist, könnte sein, dass die Aufgabe von WSCP von sequenzverwandten Proteinen in *Arabidopsis* übernommen wird. In Frage kommen vor allem die Produkte der Gene At1g73330, At1g73325, At1g73260 und At1g17860, welche – wie auch das für AtWSCP kodierende Gen, At1g72290 – alle auf Chromosom 1 des *Arabidopsis*-Genoms liegen. Die entsprechenden Proteine besitzen zwischen 25 und 35% Sequenzidentität zu AtWSCP. At1g73330 kodiert für das durch Trockenstress induzierte Protein AtDr4, ein putativer Proteaseinhibitor. At1g73260 wurde kürzlich von Li und Mitarbeitern kloniert und untersucht (Li *et al.*, 2008). Sie bezeichneten das Protein als AtKT11 und haben aus ihren Ergebnissen gefolgert, dass es bei der Regulation des programmierten Zelltodes bei Pflanzen-Pathogen-Interaktionen beteiligt ist. Man müsste untersuchen, ob die Expression einer oder mehrerer dieser Proteine in den Δ WSCP-Pflanzen erhöht ist. In Anbetracht der vermuteten WSCP-Funktion als wasserlöslicher Chl-Transporter müsste auch überprüft werden, ob die sequenzverwandten Proteine Chl binden können.

Eine zweite Erklärungsmöglichkeit für den fehlenden Phänotyp der vegetativen Stadien der *Arabidopsis*- Δ WSCP-Pflanzen ist, dass WSCP in *Arabidopsis* eine andere Funktion erfüllt

und/oder nicht in dem vegetativen Gewebe exprimiert wird. Es ist in dieser Arbeit erstmals gelungen, natives *Arabidopsis*-WSCP mittels Western-Blot-Analyse zu lokalisieren. Die Ergebnisse zeigen, dass das Protein ausschließlich in den Schoten von *Arabidopsis thaliana* exprimiert wird, und dort auch nur in den jungen Schotenstadien, entsprechend der Entwicklungsstadien 15-17A nach Ferrándiz *et al.*, 1999. Dieser Befund ist im Einklang mit Literaturdaten, welche das Vorkommen von WSCP-mRNA in *Arabidopsis* ausschließlich im Karpell (Vorstufe der Schote) lokalisieren (Scutt *et al.* 2003, Wellmer *et al.*, 2004, Zimmermann *et al.*, 2004, Tung *et al.*, 2005).

Es muss aber erwähnt werden, dass es unveröffentlichte Daten von Satoh und Mitarbeitern gibt, die eine Lokalisation von WSCP vor allem in den Karpellen von *Arabidopsis* zeigen, zusätzlich aber auch in den Leitbündeln der gesamten Pflanze. Diese Daten wurden mit Hilfe eines Promotor-GUS-Konstruktes erhalten. Möglicherweise handelte es sich bei diesen Pflanzen um einen anderen Ecotyp als die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pflanzen, der WSCP auch in den Leitbündeln exprimiert.

Ein Indiz dafür, dass in den Schoten möglicherweise ein dem WSCP sequenzverwandtes Protein bei Δ WSCP-Pflanzen vermehrt exprimiert wird, lieferten die Fluoreszenzaufnahme sowie die Western-Blot-Analyse eines Proteinextraktes aus den Δ WSCP-Schoten, nach Auftrennung der Proteine mittels nativer PAGE. Bei der Fluoreszenzaufnahme des Gels ($\lambda > 610$ nm, Anregung mit UV-Licht) konnte ausschließlich bei dem Δ WSCP-Schotenextrakt eine fluoreszierende Bande beobachtet werden, die eine etwas geringere PAGE-Mobilität aufwies als die AtWSCP-Bande bei den Wildtyp(WT)-Pflanzen (s. Abb. 4-32). Gesucht wurde Chl-Fluoreszenz, in der Annahme, natives AtWSCP könne ebenso wie rekombinantes AtWSCP_{His} Chl binden (s. 5.1.6). Bei den Schotenextrakten aus den WT-Pflanzen trat jedoch keine Fluoreszenz auf Höhe der AtWSCP-Banden auf, d.h. entweder wurde kein Chl gebunden oder es wurde in so geringer Menge gebunden, dass diese hier unter der Nachweisgrenze lag. Da sich das native Protein jedoch in seinem Laufverhalten während der PAGE wie das Apo-AtWSCP_{His} verhält und nicht wie Chl-AtWSCP_{His}, welches eine deutlich geringere PAGE-Mobilität aufweist, ist anzunehmen, dass es unter diesen Umständen kein Chl bindet. Ob es sich bei der Fluoreszenz des unbekanntes Proteins tatsächlich um Chl-Fluoreszenz handelt, könnte mittels HPLC-Analyse ermittelt werden, nach Extraktion des Pigments aus der entsprechenden Proteinbande im Gel. Um eine auswertbare Menge Pigment zu erhalten müsste jedoch eine weitaus größere Probenmenge auf das Gel aufgetragen werden.

Bei der Western-Blot-Analyse des Gels mit einem Antikörper gegen rekombinantes AtWSCP_{His} trat nicht nur bei den WT-Schotenextrakten ein Chemilumineszenzsignal auf, sondern es war auch ein sehr schwaches Signal bei dem Δ WSCP-Schotenextrakt zu beobachten, welches an derselben Stelle auftrat, wo zuvor im Gel nach UV-Anregung das Fluoreszenzsignal zu sehen war. Die leichte Kreuzreaktion des AtWSCP_{His}-Antikörpers mit dem unbekanntes Protein deutet darauf hin, dass die beiden Proteine sequenzverwandt sein könnten. Um nähere Auskunft hierzu zu bekommen, könnte man die Bande des unbekanntes Proteins aus dem Gel ausschneiden und das Protein anschließend extrahieren und sequenzieren.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass AtWSCP und das unbekannte Δ WSCP-Protein verwandt sein könnten, ist ihre Stabilität. Wie auch das native AtWSCP der WT-Pflanzen ist das unbekannte Protein hitzestabil, da es noch im löslichen Überstand nachweisbar ist nachdem der Schotenextrakt 10 Min. bei 100°C gekocht wurde. Interessanterweise scheint es sich bei dem nativen Protein nicht um ein höheres Oligomer (z.B. Tetramer) zu handeln, da sein Laufverhalten in nativer PAGE (mit Deriphat-Puffer) dem des AtWSCP_{His}-Apoproteins entspricht, welches unter diesen Bedingungen als Monomer oder höchstens Dimer vorkommt (s. 4.2.3.2). Bei BoWSCP_{His} ist die monomere Form nicht hitzestabil (s. 4.1.7.1), und auch rekombinantes Chlid-AtWSCP_{His} denaturiert bei einer entsprechenden Hitzebehandlung (s. 4.1.10.2.1). Daher scheint es im Schotenextrakt Faktoren – beispielsweise Hitzeschockproteine – zu geben, die das native AtWSCP sowie das unbekannte Δ WSCP-Protein stabilisieren.

Welche Funktion WSCP in *Arabidopsis* ausübt ist noch unklar. Auch die Tatsache, dass AtWSCP nicht, wie in anderen Brassicaceen, in den Blättern lokalisiert ist, wirft Rätsel auf. Die ausschließliche Lokalisation des Proteins in den jungen Schoten der Pflanze spricht deutlich gegen eine Funktion als Chl-Transporter bei der Assemblierung der Lichtsammelkomplexe oder bei deren stress- oder seneszenzbedingtem Abbau. Möglicherweise fungiert WSCP hier stattdessen als Proteaseinhibitor bei der Pathogenabwehr. Scutt *et al.* (2003) fanden, dass die WSCP-mRNA im Karpell nur im sogenannten „Durchlassgewebe“ („*transmitting tract*“) exprimiert wird – einem potentiell durch Pilzhyphen gefährdeten Gewebe, da hier der Pollenschlauch eindringt. Es wäre auch denkbar, dass *Arabidopsis*-WSCP in den jungen Samenanlagen als Proteaseinhibitor wirkt, um diese vor Fraßfeinden zu schützen. Allerdings konnte in den noch unreifen Samen der älteren Schoten (Entwicklungsstadien 17B-18 nach Ferrándiz *et al.*, 1999) kein WSCP mehr nachgewiesen werden (s. 4.2.3.1). In reifen Samen konnte in den hier durchgeführten Western-Blot-Analysen ebenfalls kein WSCP nachgewiesen werden. Daten, die eine mögliche Funktion von AtWSCP als Proteaseinhibitor unterstützen, stammen von Halls *et al.* (2006). Sie fanden, dass das unpigmentierte rekombinante AtWSCP die Cysteinprotease Papain signifikant hemmt.

AtWSCP besitzt, wie auch BoWSCP, eine Homologie zu Künitz-Proteaseinhibitoren vom STI (*Soybean Trypsin Inhibitor*)-Typ. Im Gegensatz zu BoWSCP ist bei AtWSCP allerdings das N-proximal gelegene konservierte Motiv dieser Inhibitor-Familie nicht perfekt: an Position 5 des Motivs ist bei AtWSCP ein Alaninrest, der nicht zu den für das Motiv zulässigen Aminosäuren gehört (vgl. hierzu auch 5.2.3). Möglichkeiten der biologischen Funktion von WSCP werden in 5.2.4 weiter diskutiert.

5.2.2 WSCP kann Chlorophyll aus LHCII entfernen

Satoh und Mitarbeiter stellten 1998 in einer Studie über rekombinantes MBP-WSCP fest, dass WSCP in der Lage ist, aus isolierten Thylakoiden Chlorophyll zu entfernen. Um zu überprüfen, ob bei diesem Vorgang LHCII als Interaktionspartner für WSCP in Frage kommt und daher WSCP möglicherweise als Chl-Transporter bei Abbauprozessen des LHCII dient, wurden im Rahmen dieser Arbeit Versuche zur Interaktion von WSCP und LHCII durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass rekombinantes BoWSCP_{His} eindeutig in der Lage ist, Chlorophyll aus nativen LHCII-Trimeren zu entfernen. Insgesamt wurden durchschnittlich

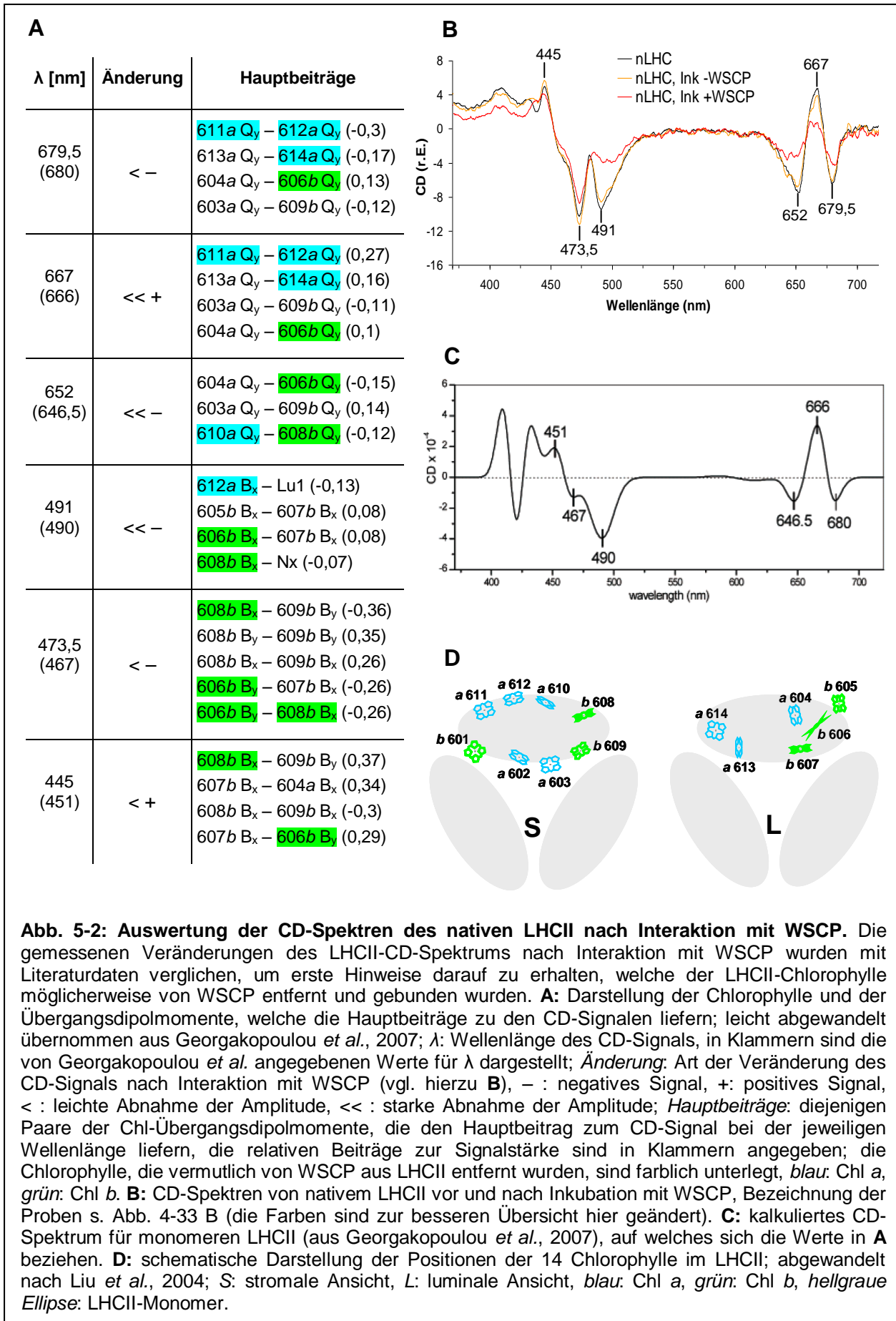
ca. 4,6 Chlorophylle pro LHCII-Monomer entfernt und von WSCP gebunden (zwei Chl pro WSCP-Tetramer; WSCP wurde bei dem Versuch in einem 100-fach molaren Überschuss eingesetzt). WSCP schien dabei nicht zwischen Chl *a* und *b* zu differenzieren – sie wurden zu etwa gleichen Anteilen aus LHCII entfernt (s. 4.2.4.1).

Am deutlichsten konnte man die veränderte Pigmentausstattung des LHCII anhand der CD-Spektren beobachten. Das CD-Spektrum der nativen Komplexe nach Inkubation mit WSCP unterschied sich drastisch von dem charakteristischen Trimer-CD-Spektrum der Kontrollprobe. Anhand dieser CD-Spektren und mit Hilfe der zusätzlich gemessenen Tieftemperaturabsorptionsspektren kann geschätzt werden, welche Chlorophylle dem LHCII entnommen wurden.

Von den Hauptsignalen im CD-Spektrum der LHCII-Trimere zeigen die Signale bei 667, 652 und 491 nm die stärksten Veränderungen in ihrer Amplitude: während das Hauptmaximum bei 667 nm ca. 85% seiner positiven Amplitude nach Interaktion mit WSCP verliert, vermindern sich die negativen Amplituden der Minima bei 650 sowie bei 490 nm jeweils um ca. 52%. Die beiden anderen Hauptminima bei 473,5 nm und bei 680 nm sind weniger stark betroffen und verringern sich um ca. 22% bzw. um ca. 28%. Georgakopoulou *et al.* (2007) konnten die CD-Signale von LHCII bestimmten Chlorophyllen im Komplex zuordnen, wobei sie ihre Messungen und Berechnungen vornehmlich an monomerem rekombinantem LHCII durchführten.

Ihre Ergebnisse sind zusammengefasst und leicht abgewandelt in Abb. 5-2 A dargestellt. Dort sieht man, dass das am stärksten betroffene CD-Signal, das Maximum bei 667 nm, hauptsächlich durch die Interaktion der q_y -Übergangsdipolmomente von Chl *a* 611 und Chl *a* 612, sowie zwischen Chl *a* 613 und Chl *a* 614 erzeugt wird (Bezeichnung der Chlorophylle nach Liu *et al.*, 2004). Einen weiteren signifikanten positiven Beitrag zu diesem CD-Signal liefert die Interaktion der q_y -Übergangsdipolmomente von Chl *a* 604 und Chl *b* 606. Bei den CD-Minima spielen bei 652 nm vor allem die Interaktion der q_y -Übergangsdipolmomente von Chl *a* 604 und Chl *b* 606, sowie von Chl *a* 610 und Chl *b* 608 eine wesentliche Rolle bei der Erzeugung des negativen CD-Signals; im Soret-Bereich, bei 491 nm, tragen vor allem die Wechselwirkung zwischen dem b_x -Übergangsdipolmoment von Chl *a* 612 und Lu 1 und zwischen dem b_x -Übergangsdipolmoment von Chl *b* 608 und Nx zur Signalstärke bei. An den weniger stark betroffenen CD-Signalen sind vor allem die Chl-Paare *a* 611/*a* 612, *a* 613/*a* 614 und *a* 603/*b* 609 beteiligt (bei 680 nm), sowie *b* 608/*b* 609, *b* 606/*b* 607 und *b* 606/*b* 608 (bei 473,5 nm), und schließlich noch *b* 608/*b* 609, *b* 607/*a* 604 und *b* 607/*b* 606 (bei 445 nm).

Es sollte noch angemerkt werden, dass die teilweise starken Abweichungen zwischen den in Abb. 5-2 A-C angegebenen Wellenlängen für die Positionen der CD-Minima und Maxima mehrere Ursachen haben können. Zum einen handelt es sich bei den in dieser Arbeit gemessenen Proben (Abb. 5-2 B) um trimeren LHCII, während Georgakopoulou *et al.* vornehmlich an Monomeren gemessen haben. Zum anderen ist das in Abb. 5-2 C dargestellte Spektrum ein rein kalkuliertes Monomerspektrum, kein gemessenes. Die Minima und Maxima des tatsächlich von den Autoren gemessenen LHCII-Monomerspektrums stimmen größtenteils besser überein mit den hier angegebenen Werten und liegen bei 681, 669, 648, 491 und 444 nm.



Wenn man annimmt, dass die in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen des LHCII-CD-Signals nach Entnahme einiger Chlorophylle durch WSCP praktisch nur auf das Fehlen einiger Chl-Absorptionsformen zurückzuführen ist, und nicht durch eventuell auftretende strukturelle Veränderungen hervorgerufen werden, lassen sich Vermutungen anstellen, welche Chlorophylle am wahrscheinlichsten von WSCP entfernt und gebunden wurden.

Unter Berücksichtigung aller in Abb. 5-2 A angegebenen relativen (positiven bzw. negativen) Beiträge zur Signalstärke und der Veränderungen im LHCII-CD-Spektrum nach Interaktion mit WSCP (Abb. 5-2 B), sowie der zusätzlich in Georgakopoulou *et al.* (2007) angegebenen Daten, ergeben sich für Chl *a* vor allem die Chlorophylle *a* 611, 612 und 614 und bei Chl *b* vor allem die Chlorophylle *b* 606 und 608 als wahrscheinlichste Kandidaten für die von WSCP entfernten Pigmente. Bei Chl *a* kommen außerdem noch *a* 610 und eventuell auch *a* 613 in Frage, bei Chl *b* möglicherweise noch *b* 601. Vergleicht man dazu noch das CD-Spektrum der Kontrollprobe (Abb. 5-2 B, „*nLHC*, *Ink* – *WSCP*“), welche unter den gewählten Versuchsbedingungen auch ein Chl-*a*-Molekül verloren hat (s. Tab. 4-8), so scheint es sich bei diesem Verlust um Chl *a* 610 zu handeln. Dieses CD-Spektrum zeigt nur geringe Veränderungen gegenüber der unbehandelten LHC-Probe („*nLHC*“). Eine Auswertung dieser Veränderungen mit Hilfe der Daten aus Georgakopoulou *et al.*, 2007, („*Figure 4*“ und „*Table 3*“, hier nicht gezeigt) lässt auf Chl *a* 610 als das bei diesem Komplex fehlende Chl-*a*-Molekül schließen – dieses liegt außen im Trimer (s. Abb. 5-2 D) und scheint nicht sehr stark von LHCII gebunden zu werden, da es bei der Kontrollprobe vom Komplex abdiffundiert. Das bedeutet, dass bei den mit WSCP inkubierten LHCII-Komplexen die fehlenden 3,5 Chl-*a*-Moleküle (im Vergleich zur unbehandelten LHC-Probe, s. auch Tab. 4-8) nicht alle aktiv von WSCP entfernt wurden, sondern eines davon (sehr wahrscheinlich Chl *a* 610) ohnehin vom LHCII verloren wurde unter den Versuchsbedingungen.

Die Annahme, dass es einen Verlust der Chlorophylle *a* 612 und 614 sowie *b* 606 gegeben hat, wird durch die zusätzlich gemessenen Tieftemperaturabsorptionsspektren unterstützt (Abb. 4-33 A). Bei den 77K-Spektren der LHCII-Komplexe nach Wechselwirkung mit WSCP fehlt gegenüber den Kontrollproben eindeutig eine Chl-Absorptionsform bei ca. 660 nm. Auch das Chl-*a*- bzw. Chl-*b*-Maximum bei 675 bzw. 649 nm ist deutlich abgeflacht und verbreitert, so dass auch hier jeweils eine Chl-Absorptionsform zu fehlen scheint. Diese drei Absorptionsformen wurden von Rogl *et al.* (2002) eindeutig den Chlorophyllen *a* 612 (bei 675 nm), *a* 614 (bei 659 nm) und *b* 606 (bei 649 nm) zugeordnet.

Die meisten der vermutlich von WSCP entfernten Chlorophylle liegen im LHCII-Trimer an der Außenseite der jeweiligen Monomere (s. Abb. 5-2 D) und sind somit leicht zugänglich für WSCP. Würden die meisten der fehlenden Chlorophylle eher innen im Trimer liegen, z.B. an der Interaktionsfläche der Monomere oder an ihrer Innenseite, würde dies eher für eine spezifische Wechselwirkung zwischen WSCP und LHCII sprechen. Daher kann anhand dieser Ergebnisse keine klare Aussage gemacht werden, ob LHCII und WSCP auch *in vivo* Interaktionspartner sind.

Ob WSCP tatsächlich eine Funktion als Chl-Transporter bei stress- oder seneszenzbedingtem Abbau von LHCII-Komplexen einnimmt, kann ebenfalls noch nicht klar beantwortet werden. Diese Ergebnisse unterstützen zwar die Hypothese, jedoch wäre in dem Fall einer solchen Funktion auch eine Wechselwirkung mit Chlorophyllase zu erwarten,

dem ersten Enzym des Chl-Abbaus. WSCP wäre als wasserlösliches, Chlorophyll-bindendes Protein in der Lage, die Chlorophylle von den dissoziierten LHCII-Komplexen durch das Chloroplastenstroma bis zur Chloroplastenhüllmembran zu transportieren, wo die Chlorophyllase lokalisiert ist (Matile *et al.*, 1997). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit BoWSCP_{his} und verschiedenen Chlorophyllasen zeigten jedoch keinerlei Indizien dafür, dass diese zwei Proteine miteinander interagieren und WSCP seine gebundenen Chlorophylle an die Chlorophyllase abgeben kann.

5.2.3 Enzyminhibitions-Assays

Die Expression von Proteinen mit einer proteasehemmenden Funktion dient bei Pflanzen neben dem Schutz gegen endogene Proteasen oft als Abwehrmechanismus gegen Fraßfeinde, indem sie Verdauungsenzyme der Herbivoren hemmen, was sich negativ auf deren Wachstum und Entwicklung auswirkt (De Leo *et al.*, 2002). Klasse-II-WSCPs besitzen N-proximal eine Aminosäuresequenz, die eine Homologie zu Kunitz-Proteaseinhibitoren aufweist (Satoh *et al.*, 2001 und Abb. 8-3). Eine entsprechende proteasehemmende Funktion wurde bereits mehrmals für WSCP-Homologe aus verschiedenen Pflanzen postuliert (Downing *et al.*, 1992, und Reviron *et al.*, 1992: BnD22 aus *B.napus*; Lopez *et al.*, 1994: P22 aus *R.sativus*; Nishio und Satoh, 1997: WSCP aus *B.oleracea*). Die Zielproteasen von Kunitz-Proteaseinhibitoren sind typischerweise Serinproteasen (Fioretti *et al.*, 1987; Song und Suh, 1998), wie z.B. Trypsin, einige inhibieren jedoch Cysteinproteasen oder Aspartat-Proteasen (Mosolov und Valueva, 2005). Bisher konnte für WSCP keine inhibierende Wirkung auf Serinproteasen beobachtet werden, mit Ausnahme von BnD22, welches eine schwach inhibierende Wirkung auf Chymotrypsin zeigt (Ilami *et al.*, 1997). Kamimura *et al.* (1997) stellten für natives WSCP aus Rosenkohl fest, dass es weder Trypsin noch Chymotrypsin inhibiert; auch Nishio und Satoh (1997) konnten keine inhibitorische Wirkung von Blumenkohl-WSCP auf Trypsin beobachten. Für rekombinantes WSCP aus *Arabidopsis thaliana* wurde jedoch eine hemmende Wirkung auf die Cysteinproteasen Papain und „*proaleurain maturation protease*“ beobachtet (Halls *et al.*, 2006). Die Autoren postulieren ebenfalls eine hemmende Wirkung auf die „*proaleurain maturation protease*“ durch ein WSCP-Homolog aus Blumenkohlblüten (in der NCBI-Datenbank als WSCP2 beschrieben).

Arabidopsis-WSCP sowie WSCP2 aus Blumenkohl besitzen 62% bzw. 54% Sequenzidentität zu dem in dieser Arbeit erforschten Blumenkohl-WSCP (WSCP aus Blumenkohlblättern; hier als BoWSCP bezeichnet, in der NCBI-Datenbank als WSCP1 beschrieben). Zudem besitzen diese drei Proteine in ihrer maturen Form jeweils zwei konservierte Cysteinreste – ein typisches Merkmal von Kunitz-Proteaseinhibitoren, die mindestens eine intramolekulare Disulfidbrücke besitzen (Major und Constabel, 2008). Es stellte sich demnach die interessante Frage, ob BoWSCP ebenfalls in der Lage ist, Papain zu inhibieren. Diese Fragestellung wurde im Rahmen dieser Arbeit mit rekombinantem BoWSCP untersucht. Außer seiner Wirkung auf Papain wurde auch eine mögliche Inhibition von Trypsin untersucht. Obwohl, wie bereits erwähnt, in der Literatur (Nishio und Satoh, 1997) beschrieben wird, dass natives, pigmentiertes BoWSCP keine inhibierende Wirkung auf Trypsin besitzt, wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Kristina Gundlach (2006) eine leicht inhibierende Wirkung auf Trypsin durch das *unpigmentierte* rekombinante Protein beobachtet. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit näher untersucht – dabei wurden Trypsin-

Assays bei pH 8,3 (Optimum) sowie pH 5,5 durchgeführt, da die inhibitorische Wirkung von *Arabidopsis*-WSCP auf Papain besonders bei niedrigem pH-Wert ausgeprägt ist (Halls *et al.*, 2006). Die Trypsin-Assays erfolgten sowohl mit dem Volllängenprotein BoWSCP_{His} als auch mit dem C-terminal verkürzten, dem nativen Protein entsprechenden mBoWSCP_{His}. Die Proteine wurden in pigmentiertem sowie unpigmentiertem Zustand untersucht, um eine mögliche regulatorische Funktion der Chl-Bindung an WSCP zu überprüfen. Es konnte jedoch unter keiner der Versuchsbedingungen eine hemmende Wirkung auf die Trypsinaktivität festgestellt werden, obwohl das Protein N-proximal das perfekte Motiv der Kunitz-Familie besitzt, [LIVM]-x-D-{EK}-[EDNTY]-[DG]-[RKHDENQ]-x-[LIVM]-x-{E}-{Q}-x(2)-Y-x-[LIVM] (PROSITE: PS00283).

Der Grund für die mangelnde inhibitorische Aktivität gegenüber Trypsin könnte das Fehlen eines für diese Funktion essentiellen Aminosäurerests im reaktiven Zentrum sein. Für eine Trypsin-inhibitorische Funktion ist typischerweise an der P₁-Stelle ein Arginin- oder Lysinrest vorhanden (Laskowski und Kato, 1980). Nishio und Satoh (1997) vermuteten, dass ein dem BoWSCP zu 92% identisches Protein aus *Brassica napus*, BnD22, keine hemmende Wirkung auf Trypsin besitzt, da ihm der konservierte Argininrest fehlt – an der entsprechenden Stelle ist ein Valinrest lokalisiert. Bislang wurde diese Vermutung jedoch nicht überprüft und verifiziert. Bei BoWSCP ist ebenso in der putativen inhibitorischen Region an dieser Stelle ein Valinrest anstelle eines Arginin- oder Lysinrestes lokalisiert.

Die ebenfalls durchgeführten Papain-Assays zeigten, dass die Anwesenheit von WSCP im Reaktionsansatz die Papainaktivität um ca. 14% verringerte. Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen pigmentiertem und unpigmentiertem WSCP hinsichtlich der hemmenden Wirkung auf Papain festgestellt werden – dieser Befund spricht gegen die oben erwähnte mögliche regulatorische Funktion der Chl-Bindung. Allerdings nur, wenn es sich bei der hier beobachteten Proteasehemmung wirklich um eine spezifische Wechselwirkung zwischen WSCP und Papain handelt. Immerhin wurde WSCP in einem fünffach molaren Überschuss eingesetzt und zeigt für diese Verhältnisse kaum eine Wirkung auf die Proteaseaktivität. Es könnte sein, dass BoWSCP zwar ein Cysteinproteaseinhibitor ist, Papain jedoch nicht seine Zielprotease ist. Weitere Cysteinproteasen, die bei potentiellen Fraßfeinden im Verdauungstrakt vorkommen, sind z.B. die Cathepsine B, H und L (Koiwa *et al.*, 1997). Es wäre demnach vorstellbar, dass WSCP ein potenter Inhibitor eines dieser Enzyme ist.

Ein weiteres Enzym, welches auf eine Wechselwirkung mit WSCP untersucht wurde, ist Myrosinase. Bei diesem Enzym handelt es sich nicht um eine Protease, sondern die Myrosinase, auch Thioglucosidase genannt, ist bei Brassicaceen für die für diese Pflanzenfamilie typische „Senfölbombe“ verantwortlich, welche eine Abwehrreaktion bei Gewebeerletzungen darstellt. Das in den sogenannten Myrosinzellen kompartimentierte Enzym kommt bei Beschädigungen des Gewebes mit seinem Substrat in Kontakt und setzt bei seiner Spaltung Senföl frei, welches einen stechenden Geruch besitzt und somit z.B. einen Schutz gegen Fraßfeinde darstellt (Bennett und Wallsgrove, 1994).

Da es erste Hinweise dafür gibt, dass WSCP in *Lepidium virginicum* in den Myrosinzellen exprimiert wird (Satoh und Mitarbeiter, unveröffentlichte Ergebnisse), sollte hier untersucht werden, ob WSCP ein potentieller Interaktionspartner von Myrosinase sein könnte. Auch

eine mögliche regulatorische Funktion der Chl-Bindung an WSCP sollte überprüft werden. Denkbar wäre beispielsweise, dass unpigmentiertes WSCP in den Myrosinzellen als Komplex mit Myrosinase vorliegt und das Enzym hemmt. Als Folge von Gewebeerletzungen würden Chlorophylle freigesetzt, welche von WSCP gebunden würden wegen seiner sehr hohen Affinität für diese Pigmente. Aufgrund einer durch die Pigmentbindung bedingten Konformationsänderung (vgl. 5.1.2) könnte sich das WSCP von der Myrosinase lösen und das Enzym wäre einsatzbereit.

Die Myrosinase-Assays, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigten jedoch widersprüchliche Ergebnisse. Je nach gewählter Assay-Methode wurde entweder eine leicht hemmende Wirkung durch Apo-WSCP beobachtet bei gleichzeitiger leicht fördernder Wirkung der Myrosinaseaktivität durch Chl-WSCP, oder es konnte genau das Gegenteil beobachtet werden. Die erste Variante war stör- und fehleranfällig, da der Aktivitätsnachweis im UV-Bereich gemessen wurde; die zweite Variante beruhte größtenteils auf einem Artefakt bei der Nachweismethode des bei der Myrosinasereaktion entstehenden Produktes Glucose (s. ausführlich in 4.2.4.3.3 und 4.2.4.4). Weiterhin ergaben sich in dieser Arbeit Hinweise, dass WSCP möglicherweise Glucose binden kann. Das Substrat der Myrosinase, Sinigrin, ist ein Senfölglycosid und enthält somit eine Glucosegruppe. Es wäre also denkbar, dass WSCP und Myrosinase über Sinigrin miteinander wechselwirken. Erste Versuche zur Sinigrinbindung von WSCP lieferten noch keine eindeutigen Ergebnisse und müssten wiederholt werden. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse ist also nicht auszuschließen, dass WSCP, zumindest in *L. virginicum*, tatsächlich einen *in vivo*-Interaktionspartner der Myrosinase darstellt.

Eine Möglichkeit, dieser Hypothese weiter nachzugehen, ist die Durchführung einer Co-Immunopräzipitation mit Myrosinase- oder WSCP-Antikörper. Da bei der Homogenisierung des Pflanzenmaterials Chlorophylle frei werden, würde dies jedoch nur funktionieren, wenn auch *pigmentiertes* WSCP mit Myrosinase interagiert und nicht, wie postuliert, nur unpigmentiertes WSCP. Um dieses Problem zu umgehen, wäre auch eine Detektion der beiden Proteine *in vivo* mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und entsprechend markierter Antikörper gegen WSCP bzw. Myrosinase denkbar. Für einen möglichen Interaktionsnachweis *in vitro* kommt außerdem noch ein Pulldown-Assay in Frage, bei dem rekombinantes (Apo-) WSCP über seinen Hexahistidylrest an einer Säulenmatrix immobilisiert und mit (depigmentiertem) *L. virginicum*-Proteinextrakt inkubiert wird. Nach dem Waschen der Säule und Eluieren des WSCP (mit möglichen Interaktionspartnern) kann das Eluat mittels SDS-PAGE und anschließender Western-Blot-Analyse auf die Anwesenheit von Myrosinase untersucht werden. Sinnvoll wäre es, in solch einem Pulldown-Assay rekombinantes WSCP aus *L. virginicum* zu verwenden und nicht das in dieser Arbeit verwendete rekombinante Blumenkohl-WSCP, da LwWSCP und BoWSCP nur 41% Sequenzidentität besitzen.

Zusammenfassend zu den Enzym-Assays kann also gesagt werden, dass keine inhibitorische Wirkung von WSCP – pigmentiert oder unpigmentiert – auf Trypsin beobachtet werden konnte, es wurde jedoch reproduzierbar eine geringfügig hemmende Wirkung auf Papain beobachtet. Diese war unabhängig von dem verwendeten WSCP-Klon (Volllängenprotein, oder dem maturen Protein entsprechenden, C-terminal verkürzten Protein) und auch davon, ob WSCP pigmentiert oder unpigmentiert war. WSCP aus Blumenkohlblättern könnte also

ein Cysteinprotease-Inhibitor sein, wobei Papain nicht der native Interaktionspartner zu sein scheint. Die durchgeführten Assays mit Myrosinase lassen außerdem nicht ausschließen, dass dieses Enzym *in vivo* ein Interaktionspartner von WSCP ist – zumindest in *Lepidium virginicum* – und dass eine mögliche Funktion von WSCP in dieser Pflanze in der Regulation der Myrosinaseaktivität besteht.

5.2.4 Überlegungen zur biologischen Funktion von WSCP

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche, um der Antwort nach der biologischen Funktion von WSCP näher zu kommen, lieferten vielfältige und unterschiedliche Hinweise. Einige deuten darauf hin, dass WSCP als Chl-Carrier fungieren könnte, andere wiederum liefern Argumente dafür, dass WSCP in der Pflanze möglicherweise eine Funktion als Proteaseinhibitor erfüllt.

Auch in der Literatur gibt es bezüglich der biologischen Funktion von WSCP verschiedene – teilweise sehr unterschiedliche – Hypothesen. Am häufigsten vertreten ist dabei die postulierte Funktion als (stressinduzierter) Proteaseinhibitor, obwohl bislang für fast kein WSCP eine solche Aktivität gemessen werden konnte (vgl. 5.2.3). Die aufgestellten Hypothesen variieren mit den verschiedenen Pflanzenarten aus der Familie der Brassicaceen. Bei *Brassica oleracea* var. *botrytis* werden sogar innerhalb derselben Pflanze unterschiedliche Funktionen für die WSCP-Isoformen WSCP1 (entspricht dem in dieser Arbeit untersuchten BoWSCP) und WSCP2, welche in zwei verschiedenen Pflanzenorganen (Blätter bzw. Infloreszenz) lokalisiert sind, postuliert.

Eine Übersicht über die bisher in der Literatur postulierten biologischen Funktionen für WSCP bzw. WSCP-Homologe in Brassicaceen gibt folgende Tabelle:

Tab. 5-1: Zusammenfassung der bislang für WSCP bzw. WSCP-Homologe postulierten Funktionen in *Brassicaceae*.

Postulierte Funktion	Literaturquelle	Name	Information
(Stressinduzierter) Künitz (Serin-) Proteaseinhibitor	Downing <i>et al.</i> , 1992 Reviron <i>et al.</i> , 1992 Ilami <i>et al.</i> , 1997	BnD22	induziert durch Trocken- und Salzstress in den Blättern von <i>B. napus</i>
	Lopez <i>et al.</i> , 1994	P22	induziert durch Trocken- und Salzstress in den Blättern von <i>R. sativus</i>
	Nishio und Satoh, 1997	WSCP	induziert durch Blattabszision in den Blättern von <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>
	Annamalai und Yanagihara, 1999	BoHS1	induziert durch Hitzestress in den Blättern von <i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>
	Etienne <i>et al.</i> , 2007 Desclos <i>et al.</i> , 2008	BnD22	vermutlich wichtige Rolle als Proteaseinhibitor bei der Kontrolle der N-Mobilisation bei Seneszenz in <i>B. napus</i>
Cysteinproteaseinhibitor	Halls <i>et al.</i> , 2006	At1g72290p	aus <i>A. thaliana</i> ; inhibiert Papain und „ <i>proaleurain maturation protease</i> “
Carrier für Chl und/oder Chl-Derivate im Chl-Katabolismus und -Anabolismus	Satoh <i>et al.</i> , 1998	WSCP	aus <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> ; kann Chl aus Thylakoiden entfernen
	Schmidt <i>et al.</i> , 2003	WSCP (= BoWSCP in dieser Arbeit)	möglicher Carrier von Chl und/oder Derivaten im Chl-Katabolismus und -Anabolismus
Regulierender Faktor bei der Aleurain-aktivierung	Halls <i>et al.</i> , 2006	cauliflower Künitz inhibitor (WSCP2 in NCBI-Datenbank)	aus Infloreszenz von <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> ; bindet <i>in vivo</i> an „ <i>proaleurain maturation protease</i> “; bei transienter Expression in Tabak-Protoplasten: Co-Lokalisation mit BP-80
Pathogenabwehr, antimykotischer Faktor	Scutt <i>et al.</i> , 2003	Pup5	aus <i>A. thaliana</i> : Expression der mRNA ausschließlich im „ <i>transmitting tract</i> “ im Karpell

Weiterhin fanden Huseynova *et al.* (2007) bei Gerste (*Hordeum vulgare*), dass unter Trockenstress ein 21,5 kDa Protein akkumuliert – dasselbe, welches von Reinbothe *et al.* (2004a) ansequenziert und als WSCP-Homolog klassifiziert wurde (HvWSCP). Reinbothe *et al.* (2004a und 2004b) postulierten eine Funktion dieses Proteins als Chlid-Transporter bei der lichtinduzierten Chloroplastenentwicklung. Schließlich ließen noch Ergebnisse von Satoh und Mitarbeitern (unveröffentlicht) vermuten, dass WSCP in *L. virginicum* an der „Senfölbombe“, der typischen Antwort von Brassicaceen auf Gewebeverletzung, beteiligt ist.

Wie man in Tab. 5-1 sehen kann, weist die Mehrzahl der experimentellen Daten darauf hin, dass WSCPs bzw. WSCP-Homologe stressinduzierte Proteine sind, die möglicherweise eine Funktion als Proteaseinhibitoren ausüben. Wie bereits in 5.2.3 besprochen, zeigen bislang jedoch nur sehr wenige der untersuchten WSCPs einen inhibitorischen Effekt auf Proteasen, und dieser ist auch meistens nur gering. Es ist natürlich trotzdem nicht auszuschließen, dass es sich bei der jeweiligen Zielprotease um eine ganz andere Protease als die jeweils untersuchte handelt.

Gegen eine Funktion des WSCP als Chl-(Derivat-)Transporter spricht seine geringe Chl-Beladung. Mit nur 1-4 Chlorophyllen pro Tetramer wäre dies von der Pflanze eine sehr unökonomische Art, die Pigmente zu transportieren. Dazu kommt noch die Tatsache, dass Chl so fest von WSCP gebunden wird, dass es nur sehr schwer extrahierbar ist – die Pigment-Protein-Komplexe müssen erst mit Detergens destabilisiert bzw. denaturiert werden, und selbst dann kann das Chl meistens nicht zu 100% extrahiert werden (vgl. 4.1.4). Wenn WSCP *in vivo* als Chl-Transporter dient, muss demnach der putative Interaktionspartner, an den die Chlorophylle abgegeben werden, in solch einer Weise mit WSCP interagieren, dass WSCP seine Konformation so ändert, dass es seine hohe Chl-Affinität verliert, bzw. dass die im inneren „versteckten“ Chlorophylle zugänglich sind und der Partner die Chlorophylle übernehmen kann.

Für eine Funktion als Chl-Transporter muss auch die Lokalisation von WSCP im Chloroplastenstroma gewährleistet sein. Es gibt bislang jedoch nur eine Literaturquelle (Murata, 1986), in der WSCP bei Brassicaceen als Bestandteil der löslichen Chloroplastenfraktion entdeckt wurde, und zwar in *Lepidium virginicum*. Sonst ist nur in der Literatur beschrieben, dass das bereits erwähnte, als WSCP-Homolog klassifizierte Protein aus *Hordeum vulgare* (HvWSCP), im Stroma von Etiochloroplasten lokalisiert ist (Reinbothe *et al.*, 2004a). BoWSCP sowie sein Homolog aus *B. napus*, BnD22, besitzen jedoch N-terminal eine Signalsequenz, die zum Transport ins ER dient (Sato *et al.*, 2001; Downing *et al.*, 1992). Auch eine Lokalisation von BnD22 in der Vakuole ist möglich (Downing *et al.*, 1992). Lopez *et al.* (1994) beschreiben außerdem bei dem WSCP-Homolog in *R. sativus*, P22, eine C-proximale Erkennungssequenz, welche zum Transport in Microbodies dienen könnte.

Wenn WSCP nicht als Chl-Transportprotein dient, stellt sich natürlich die Frage, wieso es überhaupt Chl bindet – vor allem mit einer solch hohen Affinität – da aufgrund seiner Wasserlöslichkeit und seiner geringen Chl-Beladung auch eine lichtsammelnde Funktion bei der Photosynthese höchst unwahrscheinlich ist. Die alternative Hypothese, dass die Chl-Bindung eine regulatorische Aufgabe ausübt und beispielsweise WSCP in seiner Funktion „an“ und „aus“ schaltet, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. In den hierzu durchgeführten Enzym-Assays konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Chl- und Apo-BoWSCPis festgestellt werden.

Um weiterhin nach der physiologischen Aufgabe von BoWSCP zu forschen, wäre es sinnvoll, auch natives BoWSCP zu untersuchen, da dies möglicherweise posttranslational modifiziert ist und sich somit vom rekombinanten Protein unterscheidet. Es gibt Hinweise darauf, dass eine Isoform von BoWSCP (WSCP2) glykosyliert ist (Sato *et al.*, 2001), da sie C-proximal das Motiv für N-Glykosylierung besitzt (N-{P}-[ST]-{P}, PROSITE: PS00001). BoWSCP

besitzt kein N-Glykolysierungsmotiv, jedoch befinden sich in seiner Aminosäuresequenz zwei potentielle Protein Kinase C Phosphorylierungsstellen mit der Signatur [ST]-x-[RK] (PROSITE: PS00005): TYK und TSR, AS-Reste 134-136 bzw. 185-187 beim maturen Protein. Zusätzlich ist eine potentielle Casein Kinase II Phosphorylierungsstelle vorhanden mit der Signatur [ST]-x(2)-[DE] (PROSITE: PS00006): SRVE, AS-Reste 186-189 beim maturen Protein.

Natives BoWSCP konnte in dieser Arbeit jedoch trotz einer sehr aufwändigen und stringenten Aufreinigungsprozedur nie in vollkommen reiner Form aus Blumenkohlblättern isoliert werden (vgl. 4.1.1). Nach Auftrennung der WSCP-Probe mittels SDS-PAGE sind immer mindestens drei weitere Proteinbanden zu erkennen, mit Molekulargewichten von ca. 17, 30 und 35 kDa (s. Abb. 4-1). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei diesen Proteinen um *in vivo*-Interaktionspartner von WSCP handeln könnte. Bei der 17 kDa Bande könnte es sich zwar auch um ein Abbauprodukt von WSCP handeln, die anderen beiden Banden besitzen aber ein höheres Molekulargewicht als das ca. 21 kDa große WSCP-Monomer. Sie sind jedoch zu klein um WSCP-Dimere darzustellen, daher müsste es sich hierbei um Fremdproteine handeln. Eine Extraktion dieser Proteinbanden aus dem Gel mit anschließender Sequenzierung würde aufklären, um welche Proteine es sich handelt. Diese Information könnte wertvolle Hinweise auf die biologische Funktion des in Blumenkohlblättern vorkommenden WSCP liefern.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die Frage nach der biologischen Funktion von WSCP weiterhin offen ist und spannend bleibt. Ob es jedoch nur die „eine WSCP-Funktion“ bei Brassicaceen gibt, ist fraglich. Die Tatsache, dass WSCP bei den verschiedenen *Brassicaceae*-Spezies nicht immer im gleichen Pflanzenorgan exprimiert wird, und zudem in den unterschiedlichen Organen möglicherweise auch unterschiedliche Funktionen ausübt, legt die Vermutung nahe, dass es sich dabei um Paraloge handelt, deren Funktion teilweise divergiert ist.

6 Zusammenfassung

Das WSCP (*water-soluble chlorophyll protein*) der Brassicaceen ist das einzig bekannte Chlorophyll-bindende Protein, welches *keine* Carotinoide bindet. Es ist ein wasserlösliches, ca. 80 kDa großes Homotetramer mit 1-4 gebundenen Chlorophyllen. Das Protein ist äußerst stabil und vermag die gebundenen Chlorophylle vor Photooxidation zu schützen. Seine Funktion in der Pflanze ist bis heute ein Rätsel und sollte in dieser Arbeit zusammen mit seinen biochemischen Eigenschaften weiter aufgeklärt werden. Es wurden Versuche durchgeführt mit nativem und rekombinantem WSCP aus Blumenkohl (BoWSCP bzw. BoWSCP_{His}) und aus *Arabidopsis thaliana* (AtWSCP bzw. AtWSCP_{His}).

Die Expressionsausbeute von BoWSCP_{His} konnte verbessert werden und zusätzlich wurde die Rekonstitutionsmethode für das rekombinante WSCP optimiert, sodass das pigmentierte Protein mit hoher Ausbeute und großer Reinheit gewonnen werden konnte. Zudem wurde ein neuer WSCP-Klon hergestellt, mBoWSCP_{His}, der in seiner Sequenz dem murenen nativen BoWSCP entspricht und weitaus weniger Aggregationsprobleme zeigte als BoWSCP_{His}.

Weiterführende Versuche zur Stabilität und dem Oligomerisierungsgrad von WSCP haben die neue Erkenntnis erbracht, dass die Phytolschwänze der von WSCP gebundenen Chlorophylle zwar essentiell sind für die Stabilität von WSCP-Oligomeren, *nicht* aber für die Oligomerisierung selbst, wie es in der Literatur bislang postuliert wurde. Zusätzlich zu ihrer außerordentlichen Hitzestabilität erwiesen sich die Chl-WSCP-Komplexe als stabil in einem breiten pH-Spektrum. AtWSCP_{His} besaß eine vergleichbare Stabilität, und auch das Oligomerisierungsverhalten zeigte Ähnlichkeiten zu BoWSCP_{His}.

Im Rahmen einer Forschungskoooperation mit dem Institut für Optik und Atomare Physik der TU Berlin wurden zeitaufgelöste Absorptionsspektren sowie Tieftemperatur-Fluoreszenzspektren an Chl-WSCP-Komplexen gemessen. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass die WSCP-gebundenen Chlorophylle excitonisch gekoppelt sind und wiesen zudem auf unterschiedliche Chl-Bindungsmodi hin. Aufgrund seines einfachen Aufbaus und seines geringen Chlorophyllgehalts hat sich WSCP bei diesen Versuchen als sehr geeignetes Modellsystem erwiesen, um Messungen zur Chlorophyllbindung mit Vorhersagen aus theoretischen Modellen zu vergleichen.

Bei den Experimenten zur biologischen Funktion wurden einerseits *Arabidopsis thaliana* WSCP-*„knock-out“*-Pflanzen unter verschiedenen Bedingungen charakterisiert, andererseits wurden Experimente mit rekombinantem WSCP durchgeführt, um eine mögliche Interaktion mit anderen Proteinen zu detektieren. Die vegetativen Stadien der Mutante zeigten keinen Phänotyp; das native *Arabidopsis*-WSCP konnte später bei der Wildtyp-Pflanze ausschließlich in jungen Schoten lokalisiert werden, was eine Erklärung hierfür lieferte. Rekombinantes WSCP konnte Chlorophylle aus nativem LHCII entfernen, eine Interaktion mit Chlorophyllase konnte jedoch nicht nachgewiesen werden; daher konnte auch die Hypothese, WSCP sei ein Chl-Carrier beim Chl-Abbau, nicht untermauert werden. Bei den durchgeführten Enzym-Assays wurde eine geringfügige Inhibition der Cysteinprotease Papain beobachtet, aber keine Inhibition der Serinprotease Trypsin, obwohl Blumenkohl-WSCP N-terminal das Motiv der Kunitz-Proteaseinhibitoren besitzt. Die Frage nach der biologischen Funktion von WSCP bleibt also weiterhin offen.

Summary

The water-soluble chlorophyll protein (WSCP) of the *Brassicaceae* family is the only known chlorophyll-binding protein that does not bind carotenoids. It is a homotetramer of approximately 80 kDa containing 1-4 bound chlorophylls. The protein is extremely stable and protects the bound chlorophylls from photooxidation. This work concentrated on investigating the biological function of WSCP as well as its biochemical properties.. Experiments were performed with native and recombinant WSCP from cauliflower (BoWSCP and BoWSCP_{His}) and from *Arabidopsis thaliana* (AtWSCP and AtWSCP_{His}).

The yield of BoWSCP_{His} expression was improved and additionally, the reconstitution method for recombinant WSCP was optimized, so that the pigmented protein was obtained in large amounts and with high purity. Also, a new WSCP clone, named mBoWSCP_{His}, was constructed with its sequence corresponding to that of mature native BoWSCP. This protein showed far less aggregation than BoWSCP_{His}.

As opposed to an earlier report, WSCP tetramerization does not depend on the presence of phytol chains in the chlorophylls, although these *are* essential for the stability of WSCP oligomers. The Chl-WSCP complexes are not only exceptionally heat-stable but also withstand a wide range of pH values. AtWSCP_{His} proved comparably stable and also showed a similar oligomerization behavior as BoWSCP_{His}.

In the course of a research cooperation with the Optical Institute of the TU Berlin, time resolved absorption spectra as well as low-temperature fluorescence spectra of Chl-WSCP complexes were measured. The results clearly showed that the WSCP-bound chlorophylls are excitonically coupled and also indicated that there are different modes of chl-binding in WSCP. Due to its simple structure and low chlorophyll content, WSCP proved a very suitable model system for comparing measurements of chlorophyll binding to predictions based on theoretical models.

For studying the biological function of the protein, *Arabidopsis thaliana* WSCP “knock-out“ mutants were characterized under different growth and stress conditions, and also experiments with the recombinant protein were performed in order to detect possible interactions with other proteins. The vegetative stages of the mutant showed no phenotype. Consistently, in wild-type *Arabidopsis* no WSCP was detected in leaves but it was in young siliques. In experiments *in vitro*, recombinant WSCP was able to remove chlorophylls from native LHCII, but an interaction with chlorophyllase was not detected. Therefore, the hypothesis that WSCP acts as a Chl-carrier during Chl-breakdown could not be supported. Cauliflower WSCP slightly inhibited the cysteine-protease papain but did not inhibit the serine-protease trypsin in spite of its N-proximal Kunitz-type protease inhibitor motif. The biological function of WSCP therefore remains an open and interesting question.

7 Literatur

- Adamska, I.** (1997). ELIPS – Light-induced stress proteins. *Physiol Plant* **100**, 794-805.
- Adamska, I., Klopstech, K.** (1991). Evidence for an association of the early light-inducible protein (ELIP) of pea with photosystem II. *Plant Mol Biol* **16**, 209-223.
- Adamska, I., Ohad, I., Klopstech, K.** (1992). Synthesis of the early light-inducible protein is controlled by blue light and related to light stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 2610-2613.
- Adamska, I., Roobol-Bóza, M., Lindahl, M., Andersson, B.** (1999). Isolation of pigment-binding early light-inducible proteins from pea. *Eur J Biochem* **260**, 453-460.
- Annamalai, P., Yanagihara, S.** (1999). Identification and characterization of a heat-stress induced gene in cabbage encodes a Kunitz type protease inhibitor. *J Plant Physiol* **155**, 226-233.
- Arkus, K.A.J., Cahoon, E.B., Jez, J.M.** (2005). Mechanistic analysis of wheat chlorophyllase. *Arch Biochem Biophys* **438**, 146-155.
- Baneyx, F.** (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **10**, 411-421.
- Barzda, V., Mustárdy, L., Garab, G.** (1994). Size dependency of circular dichroism in macroaggregates of photosynthetic pigment-protein complexes. *Biochemistry* **33**, 10837-10841.
- Benedetti, C.E., Arruda, P.** (2002). Altering the expression of the chlorophyllase gene *ATHCOR1* in transgenic Arabidopsis caused changes in the chlorophyll-to-chlorophyllide ratio. *Plant Physiol* **128**, 1255-1263.
- Bennett, R., Wallsgrove, R.M.** (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol* **127**, 617-633.
- Berova, N., Nakanishi, K., Woody, R.W. (Eds.)** (2000). Circular Dichroism: Principles and Applications. Chapter 3: Theoretical Approach to Electronic Optical Activity, 74-82. *J. Wiley & Sons*, New York, 2nd ed.
- Blondel, A., Nageotte, R., Bedouelle, H.** (1996). Destabilizing interactions between the partners of a bifunctional fusion protein. *Protein Eng* **9**, 231-238.
- Botti, M.G., Taylor, M.G., Botting, N.P.** (1995). Studies on mechanisms of myrosinase. *J Biol Chem* **270**, 20530-20535.
- Butler, P.J.G., Kühlbrandt, W.** (1988). Determination of the aggregate size in detergent solution of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex from chloroplast membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 3797-3801.

- Casazza, A.P., Rossini, S., Rosso, M.G., Soave, C.** (2005). Mutational and expression analysis of ELIP1 and ELIP2 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **58**, 41-51.
- Compton, L.A., Johnson, Jr. W.C.** (1986). Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal Biochem* **155**, 155-167.
- De Leo, F., Volpicella, M., Licciulli, F., Liuni, S., Gallerani, R., Ceci, L.R.** (2002). PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Res* **30**, 347-348.
- Desclos, M., Dubousset, L., Etienne, P., Le Caherec, F., Satoh, H., Bonnefoy, J., Ourry, A., Avice, J.-C.** (2008). A proteomic profiling approach to reveal a novel role of *Brassica napus* drought 22 kD/water-soluble chlorophyll-binding protein in young leaves during nitrogen remobilization induced by stressful conditions. *Plant Physiol* **147**, 1830-1844.
- Downing, W.L., Mauxion, F., Fauvarque, M.-O., Reviron, M.-P., de Vienne, D., Vartanian, N., Giraudat, J.** (1992). A *Brassica napus* transcript encoding a protein related to the Kunitz protease inhibitor family accumulates upon water stress in leaves, not in seeds. *Plant J* **2**, 685-693.
- Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C.** (1991). A simple and rapid method for the preparation of genomic plant DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* **19**, 1349.
- Eisen, C.** (1991). Rekonstitution von LHCP/Pigment-Komplexen mit Chlorophyll-Analogen. *Diplomarbeit an der biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians Universität, München*.
- Etienne, P., Desclos, M., Le Gou, L., Gombert, J., Bonnefoy, J., Maurel, K., Le Dily, F., Ourry, A., Avice, J.-C.** (2007). N-protein mobilisation associated with the leaf senescence process in oilseed rape is concomitant with the disappearance of trypsin inhibitor activity. *Funct Plant Biol* **34**, 895-906.
- Ferrándiz, C., Pelaz, S., Yanofsky, M.F.** (1999). Control of carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Annu Rev Biochem* **68**, 321-354.
- Fioretti, E., Angeletti, M., Citro, G., Barra, D., Ascoli, F.** (1987). Kunitz-type inhibitors in human serum; identification and characterization. *J Biol Chem* **262**, 3586-3589.
- Gallagher, S.R., Carroll, Jr. E.J., Leonard, R.T.** (1986). A sensitive diffusion plate assay for screening inhibitors of protease activity in plant cell fractions. *Plant Physiol* **81**, 869-874.
- Georgakopoulou, S., van der Zwan, G., Bassi, R., van Grondelle, R., van Amerongen, H., Croce, R.** (2007). Understanding the changes in the circular dichroism of Light Harvesting Complex II upon varying its pigment composition and organization. *Biochemistry* **46**, 4745-4754.

- Green, B.R., Durnford, D.G.** (1996) The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**, 685-714.
- Green, B.R., Kühlbrandt, W.** (1995). Sequence conservation of light-harvesting and stress-response proteins in relation to the three-dimensional molecular structure of LHCII. *Photosynth Res* **44**, 139-148.
- Grimm, B., Kruse, E., Kloppstech, K.** (1989). Transiently expressed early light-inducible thylakoid proteins share transmembrane domains with light-harvesting chlorophyll binding proteins. *Plant Mol Biol* **13**, 583-593.
- Gundlach, K.** (2006). Water-Soluble Chlorophyll Protein: Untersuchungen zur Stabilität und Proteaseinhibition. *Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg Universität, Mainz*.
- Habib, H., Fazili, K.M.** (2007). Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnol Mol Biol Rev* **2**, 68-85.
- Hagar, W.G., French, C.S.** (1983). Resolution of components of the absorption spectrum of chlorophyll-protein 668 and its phototransformation product in *Atriplex hortensis*. *Physiol Plant* **59**, 292-296.
- Hagar, W.G., Hiyama, T.** (1979). Characterization of the light-induced transient states of the chlorophyll proteins 668 and 743 from *Atriplex rosea*. *Plant Physiol* **63**, 1182-1186.
- Halls, C.E., Rogers, S.W., Oufattole, M., Østergard, O., Svensson, B., Rogers, J.C.** (2006). A Kunitz-type cysteine protease inhibitor from cauliflower and *Arabidopsis*. *Plant Sci* **170**, 1102-1110.
- Heddad, M., Adamska, I.** (2000). Light stress-regulated two-helix proteins in *Arabidopsis thaliana* related to the chlorophyll *a/b*-binding gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 3741-3746.
- Heinze, I., Pfündel, E., Hühn, M., Dau, H.** (1997). Assembly of light harvesting complexes II (LHC-II) in the absence of lutein. A study on the α -carotenoid-free mutant C-2A'-34 of the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochim Biophys Acta* **1320**, 188-194.
- Heldt, H. W.** (2003). Pflanzenbiochemie, 3. Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, Berlin.
- Hooper, J.K., Eggink, L.L.** (1999). Assembly of light-harvesting complex II and biogenesis of thylakoid membranes in chloroplasts. *Photosynth Res* **61**, 197-215.
- Horigome, D., Satoh, H., Itoh, N., Mitsunaga, K., Oonishi, I., Nakagawa, A., Uchida, A.** (2007). Structural mechanism and photoprotective function of water-soluble chlorophyll-binding protein. *J Biol Chem* **282**, 6525-6531.
- Horn, R., Paulsen, H.** (2002). Folding *In vitro* of Light-harvesting Chlorophyll *a/b* Protein is Coupled with Pigment Binding. *J Mol Biol* **318**, 547-556.
- Hörtensteiner, S.** (2006). Chlorophyll degradation during senescence. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 55-77.

- Houssier, C., Sauer, K.** (1970). Circular dichroism and magnetic circular dichroism of the chlorophyll and protochlorophyll pigments. *J Am Chem Soc* **92**, 779-791.
- Hughes, J.L., Razeghifard, Logue, M., Oakley, A., Wydrzynski, T., Krausz, E.** (2006). Magneto-optic spectroscopy of a protein tetramer binding two exciton-coupled chlorophylls. *J Am Chem Soc* **128**, 3649-3658.
- Huseynova, I.M., Suleymanov, S.Y., Aliyev, J.A.** (2007). Structural – functional state of thylakoid membranes of wheat genotypes under water stress. *Biochim Biophys Acta* **1767**, 869-875.
- Hutin, C., Nussaume, L., Moise, N., Moya, I., Kloppstech, K., Havaux, M.** (2003). Early light-induced proteins protect *Arabidopsis* from photooxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 4921-4926.
- Ilami, G., Nespoulous, C., Huet, J.-C., Vartanian, N., Pernollet, J.-C.** (1997). Characterization of BnD22, a drought-induced protein expressed in *Brassica napus* leaves. *Phytochemistry* **45**, 1-8.
- Jiskoot, W., Crommelin, D.J.A. (Eds.)** (2005). Methods for Structural Analysis of Protein Pharmaceuticals. Chapter 3: Circular Dichroism Spectroscopy, 83-130. *AAPS Press*, Arlington, 1st ed.
- Kamimura, Y., Mori, T., Yamasaki, T., Katoh, S.** (1997). Isolation, properties and a possible function of a water-soluble chlorophyll *a/b*-protein from brussels sprouts. *Plant Cell Physiol* **38**, 133-138.
- Koiwa, H., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M.** (1997). Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends Plant Sci* **2**, 379-384.
- Köst, H.-P., Zweig, G., Sherma, J. (Eds.)** (1988). CRC Handbook of Chromatography: Plant Pigments. Vol 1: Fat-Soluble Pigments, *CRC Press*, Boca Raton.
- Król, M., Spangfort, D., Huner, N.P.A., Öquist, G., Gustafsson, P., Jansson, S.** (1995). Chlorophyll *a/b*-binding proteins, pigment conversions and early light-induced proteins in a chlorophyll *b*-less barley mutant. *Plant Physiol* **107**, 873-883.
- Kuttkat, A., Edhofer, I., Eichacker, L.A., Paulsen, H.** (1997). Light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein stably inserts into etioplast membranes supplemented with Zn-pheophytin *a/b*. *J Biol Chem* **272**, 20451-20455.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laskowski, Jr. M., Kato, I.** (1980). Protein inhibitors of proteases. *Ann Rev Biochem* **49**, 593-626.

- Lawrence, P.K., Koundal, K.R.** (2002). Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electron J Biotechnol* **5**, 93-109.
- Li, J., Brader, G., Palva, E.T.** (2008). Kunitz trypsin inhibitor: An antagonist of cell death triggered by phytopathogens and fumonisin B1 in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **1**, 482-495.
- Lion, M.** (2005). Einzelmolekülspektroskopische Studien an Farbstoff-markierten Chlorophyll-a/b-Lichtsammlerkomplexen und Untersuchungen zur Integration der Komplexe in elektrochemische Solarzellen. *Dissertation am Fachbereich Biologie an der Johannes-Gutenberg Universität, Mainz*.
- Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., An, X., Chang, W.** (2004). Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* **428**, 287-292.
- Lobley, A., Whitmore, L., Wallace, B.A.** (2002). DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics* **18**, 211-212.
- Lopez, F., Vansuyt, G., Fourcroy, P., Casse-Delbart, F.** (1994). Accumulation of a 22-kDa protein and its mRNA in the leaves of *Raphanus sativus* in response to salt stress or water deficit. *Physiol Plant* **91**, 605-614.
- Major, I.T., Constabel, C.P.** (2008). Functional analysis of the Kunitz Trypsin Inhibitor family in poplar reveals biochemical diversity and multiplicity in defense against herbivores. *Plant Phys* **146**, 888-903.
- Manavalan, P. and Johnson, Jr. W.C.** (1987). Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Anal Biochem* **167**, 76-85.
- Manning, M.C., Illangasekare, M., Woody, R.W.** (1988). Circular dichroism studies of distorted α -helices, twisted β -sheets, and β -turns. *Biophys Chem* **31**, 77-86.
- Mao, D., Wachter, E., Wallace, B.A.** (1982). Folding of the mitochondrial proton adenosinetriphosphatase proteolipid channel in phospholipid vesicles. *Biochemistry* **21**, 4960-4968.
- Martínez-García, J.F., Monte, E., Quail, P.H.** (1999). A simple, rapid and quantitative method for preparing *Arabidopsis* protein extracts for immunoblot analysis. *Plant J* **20**, 251-257.
- Matile, P., Hörtensteiner, S., Thomas, H.** (1999). Chlorophyll degradation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 67-95.
- Matile, P., Schellenberg, M., Vincentini, F.** (1997). Localization of chlorophyllase in the chloroplast envelope. *Planta* **201**, 96-99.
- Meyer, G., Kloppstech, K.** (1984). A rapidly light-induced chloroplast protein with a high turnover coded for by pea nuclear DNA. *Eur J Biochem* **138**, 201-207.
- Montané, M.-H., Kloppstech, K.** (2000). The family of light-harvesting-related proteins (LHCs, ELIPs, HLIPs): Was the harvesting of light their primary function? *Gene* **258**, 1-8.

-
- Mosolov, V.V., Valueva, T.A.** (2005). Proteinase inhibitors and their function in plants: A review. *Appl Biochem Microbiol* **41**, 227-246.
- Moss, G.P.** (1988). Nomenclature of tetrapyrroles. *Eur J Biochem* **178**, 277-328.
- Murata, T.** (1986). Studies on water-soluble chlorophyll-protein complexes in higher plants. *Dissertation an der Kyushu University, Fukuoka, Japan*.
- Murata, T., Toda, F., Uchino, K., Yakushiji, E.** (1971). Water-soluble chlorophyll protein of *Brassica oleracea* var. botrys (cauliflower). *Biochim Biophys Acta* **245**, 208-215.
- Nishio, N., Satoh, H.** (1997). A water-soluble chlorophyll protein in cauliflower may be identical to BnD22, a drought-induced, 22-kilodalton protein in rapeseed. *Plant Physiol* **115**, 841-846.
- Noguchi, T., Kamimura, Y., Inoue, Y., Itoh, S.** (1999). Photoconversion of a water-soluble chlorophyll protein from *Chenopodium album*: Resonance Raman and Fourier transform infrared study of protein and pigment structures. *Plant Cell Physiol* **40**, 305-310.
- Ohtsuki, T., Ohshima, S., Uchida, A.** (2007). Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of water-soluble chlorophyll binding protein from *Chenopodium album*. *Acta Crystallogr F* **63**, 740-741.
- Oku, T., Tomita, G.** (1975). The reversible photoconversion of *Chenopodium* chlorophyll protein and its control by the apoprotein structure. *Plant Cell Physiol* **16**, 1009-1016.
- Oku, T., Yoshida, M., Tomita, G.** (1972). The photoconversion of heat-treated *Chenopodium* chlorophyll protein and its pH dependence. *Plant Cell Physiol* **13**, 773-782.
- Palmieri, S., Leoni, O., Iori, R.** (1982). A steady-state kinetics study of myrosinase with direct ultraviolet spectrophotometric assay. *Anal Biochem* **123**, 320-324.
- Pancoska, P., Fabian, H., Yoder, G., Baumruk, V., Keiderling, T.** (1996). Protein structural segments and their interconnections derived from optical spectra. Thermal unfolding of ribonuclease T₁ as an example. *Biochemistry* **35**, 13094-13106.
- Pancoska, P., Janota, V., Keiderling, T.** (1999). Novel matrix descriptor for secondary structure segments in proteins: Demonstration of predictability from circular dichroism spectra. *Anal Biochem* **267**, 72-83.
- Paulsen, H., Rümmler, U., Rüdiger, W.** (1990). Reconstitution of pigment-containing complexes from light harvesting chlorophyll a/b-binding protein overexpressed in *Escherichia coli*. *Planta* **181**, 204-211.

- Reinbothe, C., Satoh, H., Alcaraz, J.-P., Reinbothe, S.** (2004a). A novel role of water-soluble chlorophyll proteins in the transitory storage of chlorophyllide. *Plant Physiol* **134**, 1355-1365.
- Reinbothe, C., Pollmann, S., Desvignes, C., Weigele, M., Beck, E., Reinbothe, S.** (2004b). LHPP, the light-harvesting NADPH:protochlorophyllide (Pchl_{id}) oxidoreductase:Pchl_{id} complex of etiolated plants, is developmentally expressed across the barley leaf gradient. *Plant Sci* **167**, 1027-1041.
- Renger, T., Madjet, M.E., Müh, F., Trostmann, I., Schmitt, F.-J., Theiss, C., Paulsen, H., Eichler, H.J., Knorr, A., Renger, G.** (2009). Thermally activated superradiance and intersystem crossing in the water-soluble chlorophyll-binding protein. *J Phys Chem B* **113**, 9948-9957.
- Renger, T., Trostmann, I., Theiss, C., Madjet, M.E., Richter, M., Paulsen, H., Eichler, H.J., Knorr, A., Renger, G.** (2007). Refinement of a structural model of a pigment-protein complex by accurate optical line shape theory and experiments. *J Phys Chem* **111**, 10487-10501.
- Reviron, M.-P., Vartanian, N., Sallantin, M., Huet, J.-C., Pernollet, J.-C., de Vienne, D.** (1992). Characterization of a novel protein induced by progressive or rapid drought and salinity in *Brassica napus* leaves. *Plant Physiol* **100**, 1486-1493.
- Richter, G.**, (1998). Stoffwechselfysiologie der Pflanzen. 6. Auflage, *Thieme-Verlag*, Stuttgart.
- Rogl, H., Schödel, R., Lokstein, H., Kühlbrandt, W., Schubert, A.** (2002). Assignment of spectral substructures to pigment-binding sites in higher plant light-harvesting complex LHC-II. *Biochemistry* **41**, 2281-2287.
- Ryan, C.A.** (1990). Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **28**, 425-449.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** (1977). DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467.
- Satoh, H., Nakayama, K., Okada, M.** (1998). Molecular cloning and functional expression of a water-soluble chlorophyll protein, a putative carrier of chlorophyll molecules in cauliflower. *J Biol Chem* **273**, 30568-30575.
- Satoh, H., Uchida, A., Nakayama, K., Okada, M.** (2001). Water-soluble chlorophyll protein in Brassicaceae plants is a stress-induced chlorophyll-binding protein. *Plant Cell Physiol* **42**, 906-911.
- Schmidt, K.** (2003). Pigmentbindung verschiedener Mitglieder der erweiterten Chlorophyll a/b-Proteinfamilie und des wasserlöslichen Chlorophyll-Proteins WSCP. *Dissertation am Fachbereich Biologie an der Johannes-Gutenberg Universität, Mainz.*
- Schmidt, K., Fufezan, C., Krieger-Liszkay, A., Satoh, H., Paulsen, H.** (2003). Recombinant water-soluble chlorophyll protein from *Brassica oleracea* var. *Botrys* binds various chlorophyll derivatives. *Biochemistry* **42**, 7427-7433.

- Schmitt, F.-J., Trostmann, I., Theiss, C., Pieper, J., Renger, T., Fuesers, J., Hubrich, E.H., Paulsen, H., Eichler, H.J., Renger, G.** (2008). Excited state dynamics in recombinant water-soluble chlorophyll proteins (WSCP) from cauliflower investigated by transient fluorescence spectroscopy. *J Phys Chem B* **112**, 13951-13961.
- Scutt, C.P., Vinauger-Douard, M., Fourquin, C., Ailhas, J., Kuno, N., Uchida, K., Gaude, T., Furuya, M., Dumas, C.** (2003). The identification of candidate genes for a reverse genetic analysis of development and function in the *Arabidopsis gynoecium*. *Plant Physiol* **132**, 653-665.
- Seely, G.R., Jensen, R.G.** (1965). Effect of solvent on the spectrum of chlorophyll. *Spectrochim Acta* **21**, 1835-1845.
- Song, H.K., Suh, S.W.** (1998). Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: Refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue-type plasminogen activator. *J Mol Biol* **275**, 347-363.
- Sreerama, N., Manning, M.C., Powers, M.E., Zhang, J.-X., Goldenberg, D.P., Woody, R.W.** (1999). Tyrosine, phenylalanine, and disulfide contributions to the circular dichroism of proteins: Circular dichroism spectra of wild-type and mutant bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry* **38**, 10814-10822.
- Sreerama, N., Woody, R.W.** (2000). Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem* **287**, 252-260.
- Standfuss, J., Terwisscha van Scheltinga, A.C., Lamborghini, Kühlbrandt, W.** (2005). Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *EMBO J* **24**, 919-928.
- Takamiya, A.** (1973). Distribution of photoconvertible, watersoluble chlorophyll protein complex CP668 in plants related to *Chenopodium album*. *Carnegie Inst Washington Year Book* **72**, 330-336.
- Tanaka, K., Kakuno, T., Yamashita, J., Horio, T.** (1982). Purification of chlorophyllase from greened rye seedlings. *J Biochem* **92**, 1763-1773.
- Theiss, C.** (2006). Transiente Femtosekunden-Absorptionsspektroskopie des Anregungs-Energietransfers in isolierten Pigment-Proteinkomplexen des Photosyntheseapparates. *Dissertation am Fachbereich Physik an der Technischen Universität, Berlin*.
- Theiss, C., Trostmann, I., Andree, S., Schmitt, F.J., Renger, T., Eichler, H.J., Paulsen, H., Renger, G.** (2007). Pigment-pigment and pigment-protein interactions in recombinant water-soluble chlorophyll proteins (WSCP) from cauliflower. *J Phys Chem B* **111**, 13325-13335.
- Trostmann, I.** (2004). Neoxanthinbindung im majoren Lichtsammelkomplex (LHCIIb) höherer Pflanzen. *Diplomarbeit am Fachbereich Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz*.

-
- Tung, C.-W., Dwyer, K.G., Nasrallah, M.E., Nasrallah, J.B.** (2005). Genome-wide identification of genes expressed in *Arabidopsis* pistils specifically along the path of pollen tube growth. *Plant Phys* **138**, 977-989.
- Tzvetkova-Chevolleau, T., Franck, F., Alawady, A.E., Dall'Osto, L., Carrière, F., Bassi, R., Grimm, B., Nussaume, L., Havaux, M.** (2007). The light stress-induced protein ELIP2 is a regulator of chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **50**, 795-809.
- Weil, A.** (2007). Klonierung, Überexpression und biochemische Charakterisierung des wasserlöslichen Chlorophyll-Proteins (WSCP) aus *Arabidopsis thaliana*. *Diplomarbeit am Fachbereich Biologie an der Johannes-Gutenberg Universität, Mainz*.
- Wellmer, F., Riechmann, J.L., Alves-Ferreira, M., Meyerowitz, E.M.** (2004). Genome-wide analysis of spatial gene expression in *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell* **16**, 1314-1326.
- Whitmore, L., Wallace, B.A.** (2004). DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* **32**, W668-W673 (Web Server issue).
- Yakushiji, E., Uchino, K., Sugimura, Y., Shiratori, I., Takamiya, F.** (1963). Isolation of water-soluble chlorophyll protein from the leaves of *Chenopodium album*. *Biochim Biophys Acta* **75**, 293-298.
- Zarter, C.R., Adams, W.W. III, Ebbert, V., Adamska, I., Jansson, S., Demmig-Adams, B.** (2006). Winter acclimation of PsbS and related proteins in the evergreen *Arctostaphylos uva-ursi* as influenced by altitude and light environment. *Plant Cell Environ* **29**, 869-878.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., Gruissem, W.** (2004). GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Phys* **136**, 2621-2632.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp.	Ampicillin
AMS	Ammoniumsulfat
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
AtWSCP(his)	(rekombinantes, einen Hexahistidyl-Tag tragendes) WSCP aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
B oWSCP(his)	(rekombinantes, einen Hexahistidyl-Tag tragendes) WSCP aus <i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C AP	Chloramphenicol
CD	Zirkular Dichroismus (<i>circular dichroism</i>)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
Chl	Chlorophyll
Chlid	Chlorophyllid
D a	Dalton
deg	<i>degrees</i> (Grad)
ddH ₂ O	deionisiertes, destilliertes Wasser
DEAE	Diethyl-Aminoethyl
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonucleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
F G	Frischgewicht
FPÜ	<i>French-Press</i> -Überstand (löslicher Anteil nach Zellaufbruch in der <i>French Press</i>)
fs	Femtosekunden
g gf.	gegebenenfalls
GuHCl	Guanidiniumhydrochlorid
(H is) ₆ -tag	Hexahistidyl-Tag
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
I Bs	<i>Inclusion Bodies</i>
IDA	<i>imino-diacetic acid</i>

K	Kelvin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
L-BAPNA	N(α)-Benzoyl-L-Arginin-4-Nitroanilid Hydrochlorid
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LHCII	<i>Light-Harvesting Complex II</i>
LM	Laurylmaltosid
Lu	Lutein
LvWSCP	WSCP aus <i>Lepidium virginicum</i>
M	molar (mol/l)
mA	Milliampere
mBoWSCP _{his}	rekombinantes, einen Hexahistidyl-Tag tragendes WSCP aus <i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> mit der Sequenz des maturen Proteins
MBP	<i>Maltose-Binding Protein</i>
mdeg	<i>millidegrees</i> (Milligrad)
mg	Milligramm
Min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimolar (Millimol/l)
MS	Murashige und Skoog
MW	<i>molecular weight</i>
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
NaP	Natriumphosphat
NASC	Nottingham <i>Arabidopsis</i> Stock Centre
nm	nanometer
NRMSD	<i>normalized root mean square deviation</i>
Nx	Neoxanthin
OD	optische Dichte
OG	n-Octyl- β -D-Glucosid
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PG	Phosphatidylglycerol
Pheid	Pheophorbid
Pheo	Pheophytin
ps	Picosekunden
PSI	<i>pressure per square inch</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
r.E.	relative Einheiten
RT	Raumtemperatur
S.	siehe

SDS	Natrium(<i>sodium</i>)dodecylsulfat
sec	<i>seconds</i>
s	Sekunden
St.	Stunde(n)
STI	<i>Soybean Trypsin Inhibitor</i>
t	Zeit (<i>time</i>)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Totalextrakt
TFA	Trifluoressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylmethyldiamin
TL	Teelöffel
U	<i>units</i>
UpM	Umdrehungen pro Minute
UZ	Ultrazentrifugation
Vgl.	vergleiche
v/v	<i>volume per volume</i>
WSCP	<i>Water-Soluble Chlorophyll Protein</i>
w/v	<i>weight per volume</i>

8.2 Proteineigenschaften der verwendeten WSCP-Klone

Tab. 8-1: Proteineigenschaften der verwendeten WSCP-Klone. Die Parameter wurden mit dem Programm ExpASY berechnet (s. 8.6). Der molare Extinktionskoeffizient (ϵ) gilt für das reduzierte Protein.

WSCP-Klon	Anzahl der AS	MW (Da)	ϵ_{280} ($M^{-1}cm^{-1}$)	pI (theoretisch)
AtWSCP _{his}	201	21.772	23.950	8,80
BoWSCP _{his}	210	22.987	26.930	7,80
mBoWSCP _{his}	200	21.734	25.440	6,65

8.3 Nucleotid- und Aminosäuresequenz der verwendeten WSCP-Klone

8.3.1 AtWSCP_{Phis}

	GTGAGCGGATAACAATTTTCACACAGAATTCATTAAGAGGAGAAATTAAG	<i>SphI</i> GC ATG CAC	GGA	
		M H G		3
4	AAT GAA CCG GTG AAG GAT ACA GCC GGA AAT CCA CTT AAC ACC CGC GAA			
	N E P V K D T A G N P L N T R E			19
20	CAA TAC TTC ATC CAG CCG GTT AAG ACC GAG AGT AAA AAC GGA GGT GGT			
	Q Y F I Q P V K T E S K N G G G			35
36	CTT GTC CCA GCC GCC ATT ACA GTA CTT CCC TTT TGT CCA CTT GGC ATC			
	L V P A A I T V L P F C P L G I			51
52	ACC CAA ACA CTT CTT CCC TAC CAA CCC GGC CTA CCG GTT AGC TTC GTA			
	T Q T L L P Y Q P G L P V S F V			67
68	TTA GCA CTT GGC GTA GGA TCA ACC GTT ATG ACA TCT TCG GCT GTA AAC			
	L A L G V G S T V M T S S A V N			83
84	ATC GAG TTC AAG TCC AAC ATC TGG CCG TTT TGC AAG GAG TTT TCC AAG			
	I E F K S N I W P F C K E F S K			99
100	TTT TGG GAA GTT GAT GAT TCC TCA TCA GCT CCC AAG GAG CCT TCA ATT			
	F W E V D D S S S A P K E P S I			115
116	CTC ATC GGT GGT AAA ATG GGG GAC CGA AAT AGC TCG TTT AAG ATT GAG			
	L I G G K M G D R N S S F K I E			131
132	AAA GCT GGA GAA GGA GCT AGA GCA AAC GTT TAT AAG TTG ACC ACC TTT			
	K A G E G A R A N V Y K L T T F			147
148	TAC GGA ACC GTT GGA GCC ATC CCA GGG GTT TGG TTA AGC GCA CCA CAA			
	Y G T V G A I P G V W L S A P Q			163
164	CTA ATT ATC ACC AAG GAT ACG GCT AAG ACC TTA CTC GTC AAA TTC AAA			
	L I I T K D T A K T L L V K F K			179
180	AAG GTT GAT GAT GCT ACT ACG GCT ACT AGC AAC TTA TAC TTC CCG GGT			
	K V D D A T T A T S N L Y F P G			195
196	CAC CAT CAC CAC CAT CAC TCA AGCTTAAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAG			
	H H H H H H *HindIII			201

Abb. 8-1: Nucleotid- und Aminosäuresequenz des WSCP-Klons AtWSCP_{Phis}. Angegeben ist auch die flankierende Sequenz des Expressionsvektors pDS12/RBSII, sowie die beiden für die Klonierung von AtWSCP_{Phis} verwendeten Restriktionsschnittstellen (*SphI* und *HindIII*). *grau*: Startcodon; *blau*: homolog zum Künitz Proteaseinhibitor-Motiv; *pink*: hydrophober Bereich; *grün*: homolog zur [F/Y]DPLGL-Sequenz der Cab-Proteine; *gelb*: Hexahistidylrest ((His)₆-tag); *rot*: Stoppcodon.

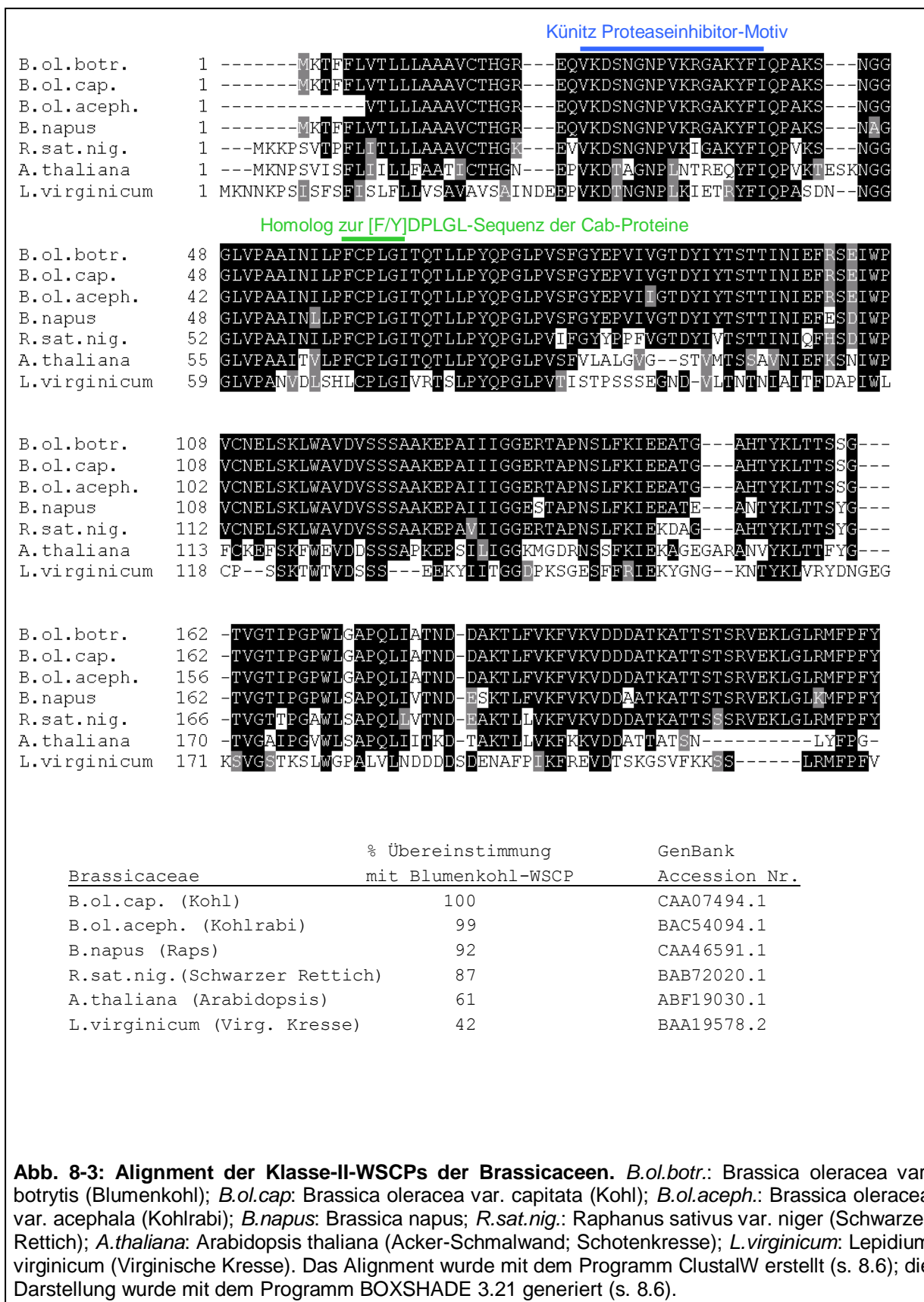
8.3.2 BoWSCPhis und mBoWSCPhis

	GTGAGCGGATAACAATTTACACAGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAAGC	<i>SphI</i>	ATG	CGT	CAC	
			M	R	H	3
4	CAT CAC CAT CAC CAT GAA TTC GAT AGA GAA CAG GTG AAG GAC TCC AAC		H	H	H	19
	H H H H H E F D R E Q V K D S N					
20	GGA AAT CCA GTT AAG CGC GGT GCA AAA TAC TTC ATC CAG CCG GCT AAG		G	N	P	35
	G N P V K R G A K Y F I Q P A K					
36	AGC AAC GGC GGT GGT CTT GTT CCA GCC GCC ATT AAC ATA CTT CCG TTT		S	N	G	51
	S N G G G L V P A A I N I L P E					
52	TGT CCA CTT GGC ATC ACC CAG ACA CTT CTT CCC TAC CAA CCG GGC CTG		C	P	L	67
	C P L G I T Q T L L P Y Q P G L					
68	CCG GTT AGC TTC GGA TAT GAG CCA GTT ATT GTC GGC ACA GAC TAC ATT		P	V	S	83
	P V S F G Y E P V I V G T D Y I					
84	TAC ACA TCT ACT ACA ATA AAC ATC GAG TTT AGG TCC GAG ATA TGG CCG		Y	T	S	99
	Y T S T T I N I E F R S E I W P					
100	GTA TGC AAC GAG CTT TCC AAG TTA TGG GCA GTC GAT GTT TCC TCA TCC		V	C	N	115
	V C N E L S K L W A V D V S S S					
116	GCT GCC AAG GAG CCT GCC ATT ATC ATA GGT GGT GAA CGG ACG GCC CCA		A	A	K	131
	A A K E P A I I I G G E R T A P					
132	AAT AGC TTG TTT AAG ATA GAA GAA GCT ACA GGA GCA CAC ACT TAC AAG		N	S	K	147
	N S K F K I E E A T G A H T Y K					
148	TTG ACC ACC TCA TCT GGA ACC GTT GGA ACC ATC CCA GGG CCA TGG TTG		L	T	T	163
	L T T S S G T V G T I P G P W L					
164	GGT GCA CCA CAG CTA ATT GCC ACC AAT GAT GAC GCT AAG ACC TTA TTC		G	A	P	179
	G A P Q L I A T N D D A K T L F					
180	GTC AAG TTC GTG AAG GTT GAT GAT GAT GCT ACT AAG GCT ACT ACT TCT		V	K	F	195
	V K F V K V D D D A T K A T T S					
196	ACT TCA CGT GTT GAG AAG TTA GGT CTA AGG ATG TTC CCA TTC TAC TAG		T	S	R	210
	T S R V E K L G L R M F P F Y *					
	TCAAAATCATGTAATATTGTAAAAATCCTGAGACTCGTCCATGGCCATGAATAACGGGTTGAG					
	ATAATACCCGCACGTATGTATGTAAACTCGTTTTTACTTTTCAGAAAAATCAAACAATTTGTGT					
	AAAAAAAAAAAAAATC					
	<u>AAGCTT</u> AATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATG					
	<i>HindIII</i>					

C-Terminus mBoWSCPhis:						
	ACT TCA CGT GTT GAG TAG		<u>T</u>	<u>AAGCTT</u>	AATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGAT	
196	T S R V E *		*	<i>HindIII</i>		200

Abb. 8-2: Nucleotid- und Aminosäuresequenz der WSCP-Klone BoWSCPhis und mBoWSCPhis. Angegeben ist auch die flankierende Sequenz des Expressionsvektors pDS12/RBSII, sowie die beiden für die Klonierung von mBoWSCPhis verwendeten Restriktionsschnittstellen (*SphI* und *HindIII*). Der Klon mBoWSCPhis entspricht in seiner Sequenz BoWSCPhis, bis auf den um 10 Aminosäuren verkürzten C-Terminus. *grau*: Startcodon; *gelb*: Hexahistidylrest ((His)₆-tag); *blau*: Kunitz Proteaseinhibitor-Motiv; *pink*: hydrophober Bereich; *grün*: homolog zur [F/Y]DPLGL-Sequenz der Cab-Proteine; *rot*: Stoppcodon.

8.4 Box-Alignment von Klasse-II-WSCPs



8.5 Ergebnisse der DichroWeb-Analysen zur Sekundärstruktur von rekombinantem WSCP

Die Analyse der CD-Spektren wurde auf dem DichroWeb-Server mit dem Algorithmus CDSSTR durchgeführt. Als Referenzdatensatz wurde „Reference Data Set 4“ ausgewählt. Näheres s. 3.1.15.2.2.

Apo-mWSCPhis NRMSD: 0,017

Helix segments per 100 residues: 2,045	Strand segments per 100 residues: 6,438
Ave helix length per segment: 3,658	Ave strand length per segment: 5,871

Apo-WSCPhis NRMSD: 0,012

Helix segments per 100 residues: 2,400	Strand segments per 100 residues: 5,734
Ave helix length per segment: 3,905	Ave strand length per segment: 5,844

Chi-mWSCPhis NRMSD: 0,011

Helix segments per 100 residues: 2,446	Strand segments per 100 residues: 5,702
Ave helix length per segment: 3,380	Ave strand length per segment: 5,577

Chi-WSCPhis NRMSD: 0,016

Helix segments per 100 residues: 2,030	Strand segments per 100 residues: 6,124
Ave helix length per segment: 3,477	Ave strand length per segment: 5,470

8.6 verwendete Analyseprogramme

Alignments mehrerer Aminosäuresequenzen für anschließende „Boxshade“-Darstellung:

ClustalW

<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>

Alignments zweier Aminosäuresequenzen mit Angabe der prozentualen Übereinstimmung:

LALIGN

http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html

Analyse der UV-CD-Spektren: DichroWeb

<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>

(DichroWeb wird gefördert vom BBSRC Centre for Protein and Membrane Structure and Dynamics (CPMSD))

Berechnung von molarem Extinktionskoeffizient von Proteinen: ExPASy, ProtParam
<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>

Berechnung von Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt von Proteinen: ExPASy, Compute pI/MW
http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html

„Boxshade“-Darstellung multipler Alignments: BOXSHADE 3.21
http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html

Suche nach Homologen anhand einer Aminosäure- oder Nucleotidsequenz: NCBI BLAST
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen ganz herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Mainz,

Inga Bektas

Lebenslauf

Publikationen

Renger, T., Madjet, M.E., Müh, F., Trostmann, I., Schmitt, F.-J., Theiss, C., Paulsen, H., Eichler, H.J., Knorr, A., Renger, G. (2009). Thermally activated superradiance and intersystem crossing in the water-soluble chlorophyll-binding protein. *J Phys Chem B* 113, 9948-9957.

Schmitt, F.-J., Trostmann, I., Theiss, C., Pieper, J., Renger, T., Fuesers, J., Hubrich, E.H., Paulsen, H., Eichler, H.J., Renger, G. (2008). Excited state dynamics in recombinant water-soluble chlorophyll proteins (WSCP) from cauliflower investigated by transient fluorescence spectroscopy. *J Phys Chem B* 112, 13951-13961.

Theiss, C., Trostmann, I., Andree, S., Schmitt, F.J., Renger, T., Eichler, H.J., Paulsen, H., Renger, G. (2007). Pigment-pigment and pigment-protein interactions in recombinant water-soluble chlorophyll proteins (WSCP) from cauliflower. *J Phys Chem B* 111, 13325-13335.

Renger, T., Trostmann, I., Theiss, C., Madjet, M.E., Richter, M., Paulsen, H., Eichler, H.J., Knorr, A., Renger, G. (2007). Refinement of a structural model of a pigment-protein complex by accurate optical line shape theory and experiments. *J Phys Chem B* 111, 10487-10501.

Hobe, S., Trostmann, I., Raunser, S., Paulsen, H. (2006) Assembly of the Major Light-Harvesting Chlorophyll-a/b Complex (LHCIIb): Thermodynamics and Kinetics of Neoxanthin Binding. *J Biol Chem* 281, 25156-25166.