

**Pigmentbindung verschiedener Mitglieder der
erweiterten Chlorophyll a/b-Proteinfamilie und des
wasserlöslichen Chlorophyll-Proteins WSCP**

**Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor
der Naturwissenschaften“**

Am Fachbereich Biologie
der Johannes-Gutenberg Universität
in Mainz

Kristin Schmidt

geboren in Minden (Westfalen)

Mainz, 2003

>>Im Lichte leben<<, das ist´s.

Hugo von Hofmannsthal

Inhalt

	<u>Seite</u>
1. Einleitung.....	1
1.1. Die Photosynthese – Grundlage allen Lebens auf der Erde	1
1.1.1. Proteine der Photosynthese	2
1.1.2. Pigmente der Photosynthese	2
1.2. Biosynthese und Abbau von Chlorophyll	2
1.2.1. Chlorophyll-Synthese	3
1.2.2. Abbau von Chlorophyll	3
1.3. Stress bei Pflanzen	5
1.4. Die Cab-Proteinfamilie	6
1.4.1. ELIPs – die „early light-induced proteins in <i>Arabidopsis thaliana</i> “	6
1.4.1.1. OHP, das “one-helix protein” aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	7
1.4.1.2. SCPs – „small <i>cab</i> -like proteins“ in Cyanobakterien	9
1.4.1.3. Sep1 und Sep2 – „stress-enhanced proteins“ aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	9
1.4.1.4. PsbS	11
1.4.2. Evolution der Chlorophyll a/b-bindenden Proteine	11
1.5. LHC II	13
1.5.1. Rekonstitution des LHC II	13
1.5.2. Import- und Insertionswege	14
1.6. Wasserlösliche, chlorophyllbindende Proteine höherer Pflanzen	15
1.6.1. Das WSCP aus <i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrys</i>	17
1.7. Zielsetzung der Arbeit	18
2. Material und Methoden.....	20
2.1. Geräte und Chemikalien	20
2.1.1. Geräte	20
2.1.2. Chemikalien	23
2.2. Molekularbiologische Methoden	24
2.2.1. Prinzip und Ziel der Klonierung von WSCP-his	24
2.2.2. Ausgangsklone	24
2.2.3. Klonierungsstrategie	25
2.2.4. Oligonucleotide	28
2.2.5. Annealing der Oligonucleotide	28
2.2.6. Phosphorylierung der Oligonucleotide	28
2.2.7. Restriktion von DNA	29
2.2.8. Agarose-Gelelektrophorese	30
2.2.9. Aufreinigung von DNA aus Gelschnipseln über eine Nucleo Trap-Säule	30
2.2.10. DNA-Quantifizierung	31
2.2.11. Dephosphorylierung des Vektors	31
2.2.12. Ligation von Vektor, Insert und Oligonucleotiden	31
2.2.13. Transformation	31
2.2.14. Test auf erfolgreiche Ligation mittels einer Induktion im Mini-Maßstab	32
2.2.15. Plasmidisolierung mittels Mini- und Midi-Präparation	32
2.2.16. Sequenzier-PCR	32
2.2.17. Anlegen von Dauerkulturen	33

2.3. Proteinbiochemische Methoden.....	34
2.3.1. Überexpression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	34
2.3.2. Aufreinigung von nativem WSCP aus Blumenkohlpflanzen	37
2.3.3. Proteinquantifizierung	38
2.3.3.1. Photometrische Quantifizierung mittels UV-Absorptionsmessung	38
2.3.3.2. BCA-Assay	40
2.3.3.3. CBQCA-Assay	40
2.3.4. Isolation und Aufreinigung von Pigmenten aus Erbsenblättern	41
2.3.4.1. Herstellung von Totalextrakt	41
2.3.4.2. Aufreinigung von Xanthophyllen	41
2.3.4.3. Aufreinigung von Chlorophyllen	43
2.3.5. Photometrische Chlorophyllbestimmung nach Porra	43
2.3.6. Photometrische Xanthophyllbestimmung	43
2.3.7. Pigmentmodifikationen	44
2.3.7.1. Aufreinigung von Chlorophyllase aus <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	44
2.3.7.2. Chlorophyllase-Assay	44
2.3.7.3. Phäophytinisierung von Chlorophyllen	45
2.3.7.4. Insertion von Zn ²⁺	45
2.3.7.5. Synthese von Phäophorbid / Zn-Phäophorbid	45
2.3.7.6. Synthese von Bakteriochlorophyll und Insertion von Kupfer	45
2.3.8. Destillation von Ether	46
2.3.9. Destillation von technischem Aceton	46
2.3.10. Rekonstitution	46
2.3.10.1. Rekonstitution durch Detergenswechsel	46
2.3.10.2. Rekonstitution mit Frier-Tau-Zyklen	47
2.3.10.3. Rekonstitution durch Verdünnung aus SDS	47
2.3.10.3.1. Rekonstitution von PsbS	48
2.3.10.4. Rekonstitution von WSCP-his durch Verdünnung aus Guanidinium Hydrochlorid	48
2.3.10.5. Rekonstitution von WSCP-his auf der Nickel-Säule	49
2.3.11. Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen	50
2.3.12. Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese	51
2.3.13. Saccharosedichtegradienten Ultrazentrifugation	53
2.3.14. Butanolextraktion von Pigmenten aus Gelschnipseln	54
2.3.15. Butanolextraktion von Pigmenten aus Gradientenbanden	54
2.3.16. High-performance liquid chromatography (HPLC)	55
2.3.17. Isoelektrische Fokussierung (IEF)	55
2.3.18. Import von Proteinen in isolierte, intakte Chloroplasten	56
2.3.18.1. Isolation von Blattextrakt	56
2.3.18.2. Isolation der Chloroplasten	57
2.3.18.3. Vorbereiten der Proteine und Dialyse	57
2.3.18.4. Importreaktion	58
2.3.18.5. Proteasebehandlung der Chloroplasten	58
2.3.18.6. Lyse der Chloroplasten	58
2.3.19. Isolation intakter Chloroplasten aus Blättern von <i>Arabidopsis thaliana</i>	59
2.3.19.1. Anzucht von <i>A. thaliana</i>	59
2.3.19.2. Isolation intakter Protoplasten	60

2.3.19.3. Chloroplasten-Isolation aus intakten Protoplasten	60
2.3.20. Insertion von Proteinen in Erbsenthylakoide	60
2.3.20.1. Isolation der Thylakoide aus intakten Chloroplasten	60
2.3.20.2. Isolation von Stromaprotein und Thylakoiden	61
2.3.20.3. Vorbereiten der Proteine und Insertionsreaktion	61
2.3.20.4. Proteaseverdau und Fällung der Proteine	62
2.III.21. Western-Blot	62
2.4. Spektroskopische Methoden	64
2.4.1. Absorptions-Spektroskopie	64
2.4.2. CD-Spektroskopie	65
2.4.3. Fluoreszenz-Spektroskopie	67
3. Ergebnisse.....	68
3.1. Versuche zur Rekonstitution und Charakterisierung des WSCP	68
3.1.1. Aufreinigung des nativen WSCP aus Blumenkohlblättern	68
3.1.2. Rekonstitutionsversuche mit dem MBP-WSCP-Fusionsprotein	68
3.1.3. Konstruktion und Überexpression von WSCP-his	69
3.1.4. WSCP-his bildet Pigmentabhängig Multimere	71
3.1.5. Chlorophylle sind essentiell für die Rekonstitution von WSCP-his	73
3.1.6. Pigmentbindende Eigenschaften des nativen und rekombinanten WSCP-Komplexes	75
3.1.7. Rekonstituiertes WSCP-his und natives WSCP haben gleiche spektroskopische Eigenschaften	76
3.1.7.1. Absorption	76
3.1.7.2. CD-Spektroskopie	77
3.1.7.3. Fluoreszenz	79
3.1.8. WSCP-his bindet die Chlorophyll-Vorstufen Chlorophyllid und Mg-Protoporphyrin IX	81
3.1.9. WSCP ist ein photostabiles und hitzestabiles Protein	85
3.1.9.1. Photostabilität	85
3.1.9.2. WSCP schützt vor Bildung von Singulett-Sauerstoff	86
3.1.9.3. Thermostabilität	87
3.2. Versuche zur Pigmentbindung des PsbS-Proteins	89
3.2.1. Rekonstitution des PsbS Proteins und Aufreinigung der pigmentierten Rekonstitutionsprodukte	89
3.2.2. Pigment-Stöchiometrien	93
3.2.3. Spektroskopische Eigenschaften des rekonstituierten PsbS-Proteins	94
3.4.2. Rekonstitution mit variierendem Pigmentangebot	98
3.2.4.1. Sind Carotinoide essentiell für die Rekonstitution des PsbS-Proteins?	98
3.2.4.2. Wird ein bestimmtes Pigment bevorzugt akkumuliert?	101
3.3. Isolierung von pigmentierten „small Cab-like proteins“ aus cyanobakteriellen Thylakoiden und Versuche zur Pigmentierung <i>in vitro</i>	104
3.3.1. Auftrennung von solubilisierten <i>Synechocystis</i> -Thylakoiden mittels IEF	104
3.3.2. Versuche zur Pigmentierung der Scp's <i>in vitro</i>	107
3.4. „One-helix-protein“ und „stress-enhanced proteins“: Versuche zur Pigmentierung <i>in vitro</i>	108

3.4.1. Versuche zur Pigmentbindung	108
3.4.2. Homologie-Modelling des OHP	114
3.4.3. Import von OHP in isolierte Erbsenchloroplasten	116
3.4.4. Import von OHP in isolierte Chloroplasten aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	118
3.4.5. Insertion von OHP in Erbsenthylakoide	119
4. Diskussion.....	121
4.1. WSCP – ein wasserlösliches chlorophyllbindendes Protein als Pigment-carrier in der Synthese / Degradation von Chlorophyll?	121
4.1.1. WSCP his faltet sich pigmentabhängig in tetramere Komplexe	121
4.1.2. Tetrameres WSCP aus Blumenkohl bindet mindestens 2 Chlorophylle	121
4.1.3. Native und rekombinante WSCP-Komplexe haben ähnliche spektroskopische Eigenschaften	122
4.1.4. WSCP bindet keine Carotinoide, ist aber photostabil	124
4.1.5. WSCP ist ein thermostabiles Protein	124
4.1.6. WSCP quencht die Bildung von Singulett-Sauerstoff (1O_2)	124
4.1.7. Rekombinantes WSCP bindet Chlorophyll-Vorstufen und Abbauprodukte	125
4.1.8. Die Rolle des Phytolrestes in der Oligomerisierung und Vermutungen zum Aufbau des WSCP-Komplexes	127
4.1.9. Spielt WSCP eine Rolle als Pigmenttransportprotein im Chlorophyllstoffwechsel?	129
4.2. PsbS – ein transient pigmentbindendes Protein?	130
4.2.1. Pigmentierte PsbS-Rekonstitutionsprodukte lassen sich über Saccharosedichtegradienten aufreinigen	130
4.2.2. Pigment-Protein-Stöchiometrien von rekonstituiertem rekombinantem PsbS im Vergleich zum nativen Protein	131
4.2.3. PsbS-Rekonstitutionsprodukte zeigen pigmentabhängig erhöhte Helixanteile, nicht aber excitonische Wechselwirkung der Pigmente	133
4.2.4. PsbS akkumuliert bevorzugt Carotinoide	134
4.2.5. PsbS – ein transients Pigmentcarrier?	135
4.3. ScpC/D – cyanobakterielle Cab-Proteine	138
4.3.1. ScpC/D und ihre Pigmentbindung in vivo – und in vitro	138
4.3.2. Funktion von ScpC/D – transiente Pigmentcarrier in Stress-Situationen?	140
4.4. OHP, Sep1 und Sep2 – sind auch die „Vorfahren“ der LHC-Proteine in der Lage, Pigmente zu binden?	141
4.4.1. Pigmentbindung der kurzen Sequenzverwandten des LHC II	141
4.4.2. OHP - Import und Insertion	142
4.5. Proteine der Cab-Familie: Hypothesen über Funktion im Bezug auf ihre Entwicklung	143
5. Zusammenfassung.....	145
6. Literatur.....	146
7. Anhang.....	152
7.1. Abkürzungen	152
7.2. Sequenzen und Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Proteine	153
7.3. Strukturen der Pigmente und Pigment-Derivate	157
7.4. Internetseiten zur Bestimmung von Proteineigenschaften	160

1. Einleitung

1.1. Die Photosynthese – Grundlage allen Lebens auf der Erde

„Man kann sich wohl vorstellen, daß der Organismus Einrichtungen besäße, mit deren Hilfe er die ihm direkt von außen zufließende Energie, Licht und Wärme, als Betriebsenergie verwenden könnte. Allein tatsächlich sehen wir, daß er es vorzieht, die Sonnenenergie in Form von chemischer Energie zu speichern. Das hat für die Pflanzen vor allem den einen großen Vorzug, daß die gespeicherte Energie durch Stoffwanderung außerordentlich leicht an andere Orte geführt werden kann (auch an solche, die wie z.B. die Wurzeln im Dunkeln leben und nicht selbst die Speicherung ausführen können), und daß sie auch zu Zeiten verwendet werden kann, in denen ein Energiegewinn unmöglich ist (z.B. nachts).“

Mit diesen Worten beschrieb Ludwig Jost 1923 in der 16. Auflage des Lehrbuches der Botanik für Hochschulen („Strasburger“) die Vorzüge der Photosynthese für die Pflanze. Bei der Photosynthese von höheren Pflanzen, Cyanobakterien und Algen wird mit Hilfe von absorbierter Lichtenergie aus Wasser und Kohlendioxid organische Substanz gebildet. Dieser Gesamtprozess gliedert sich in die Lichtreaktion, bei der durch Spaltung von Wasser Reduktionsmittel und chemische Energie (ATP) gebildet wird, und die Dunkelreaktion, bei der diese Produkte dann zur Assimilation von CO₂ verwendet werden (Heldt, 1999). Bei der Wasserspaltung entsteht bei höheren Pflanzen und Cyanobakterien molekularer Sauerstoff, von dessen Anwesenheit das aerobe Leben auf der Erde abhängt (Richter, 1996). Der Sauerstoff wird durch die hydrolytische Spaltung von Wasser freigesetzt, wobei je Wassermolekül zwei Elektronen frei werden. Diese werden über das so genannte Z-Schema der hintereinandergeschalteten Photosysteme auf das Reduktionsäquivalent NADP⁺ übertragen. Die Photosysteme bestehen aus Reaktionszentrum und Antennenkomplex und gewährleisten den Elektronenfluss in der Thylakoidmembran. Dabei wird durch den Transport von Protonen über die Thylakoidmembran ein elektrochemischer Gradient aufgebaut, der die Synthese des Energieäquivalentes ATP antreibt. ATP und NADPH+H⁺ dienen ihrerseits hauptsächlich als Substrat für die photosynthetische CO₂-Fixierung zur Bildung von Kohlenhydraten.

Licht kann nur dann photochemisch von der Pflanze genutzt werden, wenn es durch geeignete Photorezeptoren absorbiert wird. Die Energie des Sonnenlichtes wird durch Pigmente wie z.B. Chlorophyll eingefangen (Heldt, 1999). Die Reaktionszentren der Photosysteme könnten prinzipiell selbst das ankommende Lichtquant absorbieren, durch die Anwesenheit der Antennenkomplexe jedoch erhöht sich die Lichtsammeleffizienz. Lichtquanten werden von der äußeren

1. Einleitung

Antenne eingefangen und dann über die innere Antenne zum photochemischen Reaktionszentrum im Kernkomplex geleitet. Die Antenne besteht aus einer Vielzahl an Chlorophyll- und Carotinoidmolekülen, die an Proteine gebunden vorliegen.

1.1.1. Proteine der Photosynthese

Markwell und Mitarbeiter beschrieben 1979, dass in den Chloroplasten höherer Pflanzen das gesamte Chlorophyll in Chlorophyll-Protein-Komplexen gebunden vorliegt. In den Lichtsammelantennen der Photosysteme bewirken Proteine die Ausrichtung der Chromophore und machen somit eine effiziente Energieweiterleitung zum Reaktionszentrum möglich (Heldt, 1999). Diese Proteine sind Mitglieder der Chlorophyll a/b-bindenden Proteinfamilie (vgl. 1.4). Den äußeren Antennenteil bildet der Lichtsammelkomplex („light-harvesting complex“, LHC). Dazu zählen beim Photosystem II (PS II) die minoren Antennenkomplexe CP24, CP26 und CP29 und der majore Antennenkomplex LHC II (Jansson, 1994; Bassi, 1997), beim PS I der Antennenkomplex LHC I. Den inneren Teil der Antenne bilden beim PS II die beiden Untereinheiten CP43 und CP47, die die Anregungsenergie auf die Core-Komplexe mit dem photochemischen Reaktionszentrum übertragen, das aus den Proteinen D1 und D2 besteht.

1.1.2. Pigmente der Photosynthese

Das zentrale Photosynthesepigment ist das Chlorophyll (Heldt, 1999). Grüne Pflanzen haben Chlorophyll a und b, einige Algen Chlorophyll a und c (Hiller *et al.*, 1991). Diese Pigmente sind nicht-kovalent an intrinsische Membranproteine gebunden und dienen der Absorption des Lichtes. Chlorophyll absorbiert unterhalb von 480 nm und zwischen 550 und 700 nm. Das dazwischenliegende Licht des grünen Spektralbereiches wird teilweise reflektiert, das Blatt erscheint daher grün und man spricht von der Grünlücke. Bei der Absorption des Sonnenlichtes werden die Chlorophyllmoleküle angeregt. Zur besseren spektralen Ausnutzung der Photonenenergie in der Grünlücke enthalten die Antennen neben Chlorophyll a und b so genannte akzessorische Pigmente. Bei höheren Pflanzen handelt es sich dabei um Carotinoide. Die Hauptfunktion dieser Pigmente ist jedoch der Schutz gegen die Ausbildung des reaktiven Triplett-Chlorophylls, auf den noch näher eingegangen werden soll.

1.2. Biosynthese und Abbau von Chlorophyll

In dieser Arbeit wurden verschiedene Proteine in Bezug auf die Bindung von Chlorophyll sowie einiger seiner Vorstufen und Abbauprodukte hin untersucht. Da

1. Einleitung

sich der Stoffwechsel von Chlorophyll in verschiedenen Kompartimenten abspielt, ist es in diesem Zusammenhang interessant zu wissen, welche Stufen der Chlorophyll-Biosynthese bzw. des Abbaus in welchem Kompartiment zu finden sind.

1.2.1. Chlorophyll-Synthese

Die ersten Schritte auf dem Syntheseweg zum Chlorophyll finden im Stroma statt. Dort wird aus Glutamat in mehreren Schritten 5-Aminolävulinat synthetisiert. Es schließt sich die Synthese des Pyrrolrings an, durch Abspaltung von Wasser wird Porphobilinogen gebildet (siehe Abb. 1.1; für Details vgl. von Wettstein *et al.*, 1995). Als nächster Schritt wird aus vier Porphobilinogen-Molekülen über ein Zwischenprodukt der Tetrapyrrolring synthetisiert, das nächste Intermediat ist Uroporphyrinogen III (siehe Abb. 1.1). Auf dem mehrschrittigen Weg zum rot gefärbten Protoporphyrin IX, der ersten photodynamisch aktiven Chlorophyll-Vorstufe, erfolgt ein Wechsel des Kompartimentes vom Stroma zur Chloroplasten-Hüllmembran. Alle weiteren Umwandlungen finden in oder an Membranen statt. Nun wird Magnesium als Zentralatom inseriert und aus Mg-Protoporphyrin IX wird in vier Schritten zunächst Protochlorophyllid synthetisiert. Bevor dieses zum Chlorophyllid a umgesetzt wird, erfolgt ein erneuter Wechsel des Kompartimentes in die Thylakoidmembran. Dort verestert die Chlorophyll-Synthetase den Propionat-Rest des Rings IV mit Phtyl-Pyrophosphat, es entsteht Chlorophyll a. Dieses wird im Chlorophyll-Zyklus über 7¹-OH-Chlorophyll a zu Chlorophyll b konvertiert. In Abbildung 1.1 sind die Strukturformeln einiger Biosynthese-Intermediare dargestellt.

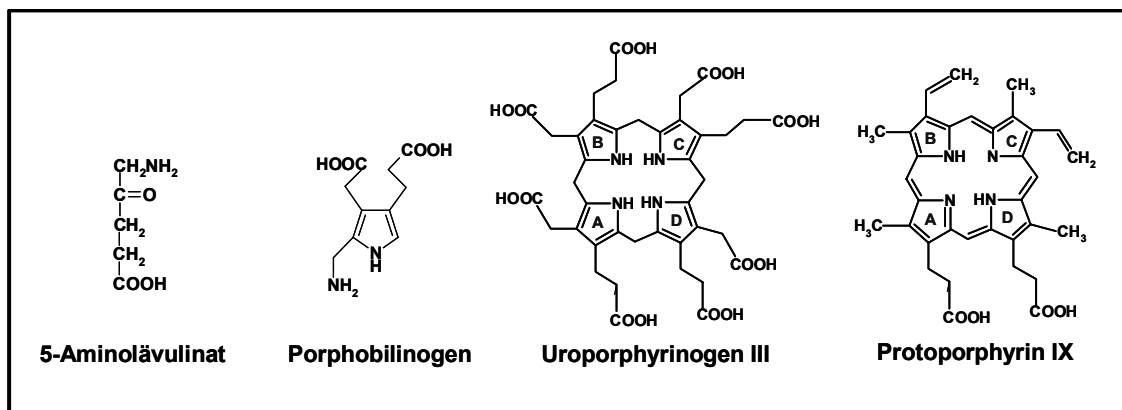


Abb. 1.1. Strukturformeln wichtiger Intermediate der Chlorophyll-Biosynthese

1.2.2. Abbau von Chlorophyll

Der erste Schritt der Chlorophylldegradation ist die Entfernung von Chlorophyll a/b aus der Thylakoidmembran (Richter, 1996). Zunächst wird Chlorophyll a/b durch

1. Einleitung

die Chlorophyllase zu Chlorophyllid a/b und Phytol hydrolysiert (Abb. 1.2; für Details vgl. Hörtensteiner, 1999). Dieses erste Enzym des Abbauweges ist im Chloroplasten-Envelope lokalisiert (Matile *et al.*, 1997). Es wird spekuliert, dass ein spezifisches Transportprotein existiert, welches das hydrophobe Chlorophyll-Molekül von der Thylakoidmembran durch das Stroma zur Hüllmembran führt (Matile *et al.*, 1997). Ein Kandidat für diesen Carrier stellt ein wasserlösliches Chlorophyll-protein dar, das 1998 in Blumenkohl beschrieben wurde (Sato *et al.*, 1998; Hörtensteiner, 1999). Die weitere Degradation von Chlorophyllid a/b findet an der Chloroplasten-Hüllmembran statt. Zunächst wird durch die Mg-Dechelatase das Zentralatom entfernt, aus Chlorophyllid wird Phäophorbid. Dieses wird dann zu den so genannten fluoreszierenden Abbauprodukten (FCCs) umgesetzt, die aus dem Chloro/Gerontoplasten in die Vakuole transportiert werden. Dort werden sie weiter zu den nicht-fluoreszierenden Abbauprodukten (NCCs) zersetzt. Die NCCs stellen die letzte Stufe des Chlorophyll-Abbaus dar und werden in der Vakuole gelagert.

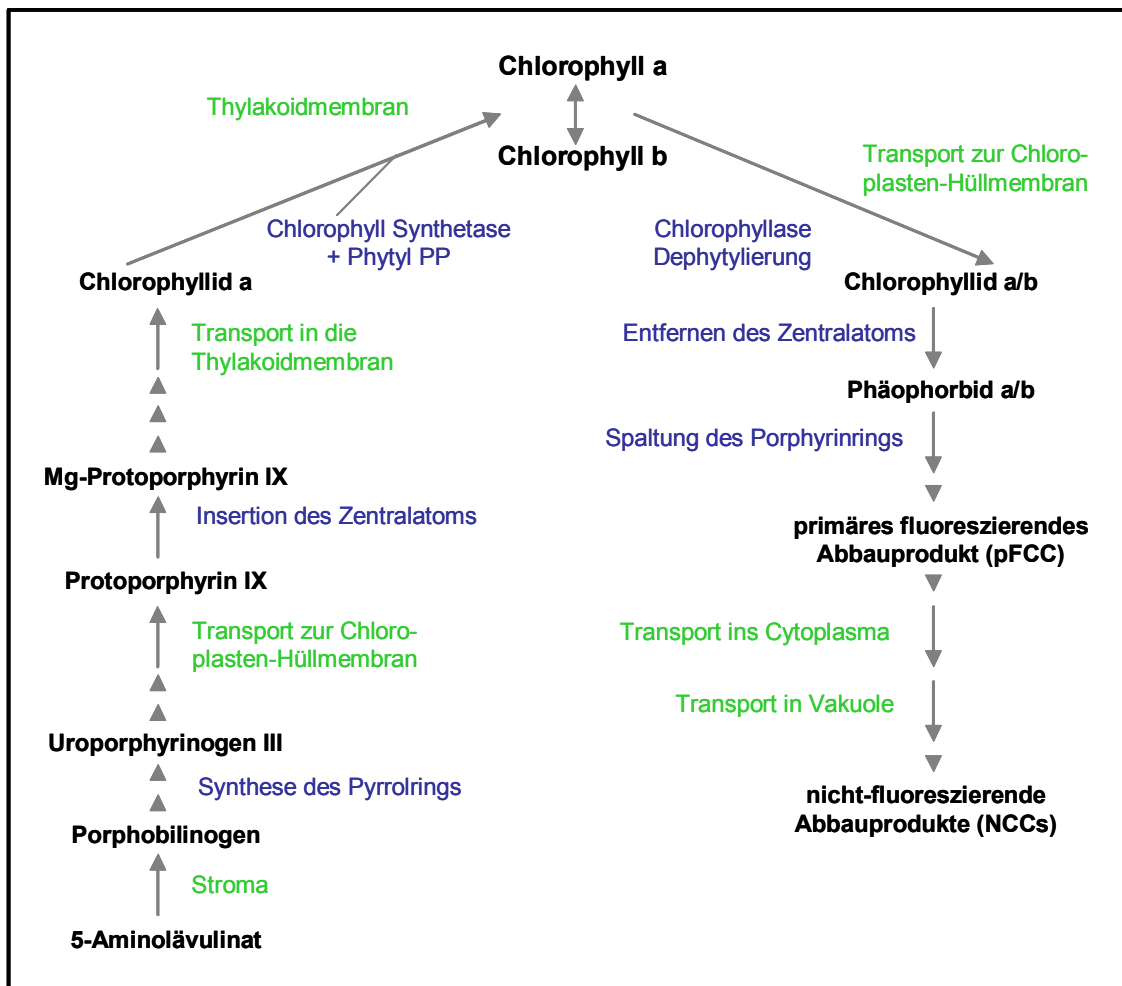


Abb. 1.2. Synthese und Abbau von Chlorophyll – Übersicht. Modifiziert nach von Wettstein *et al.*, 1995; Hörtensteiner 1999; Reinbothe & Reinbothe, 1996.

1.3. Stress bei Pflanzen

Pflanzen sind zum Leben von verschiedenen äußeren Faktoren abhängig. Dazu gehören Temperatur, Wasser, andere Nährelemente und Licht. In dieser Arbeit wurden Proteine untersucht, für deren Funktion eine Rolle in der Stressantwort der Zelle vermutet wird. Die Pflanze hat vielfältige Wege gefunden, Stress zu begegnen. Häufig spielt beispielsweise die zeitlich begrenzte, stressbedingte Genexpression eine Rolle bei der Stressantwort der Pflanze. Hitzeschockproteine funktionieren in Stress-Situationen zumeist als molekulare Chaperone, die in der Zelle Proteine sowie RNA stabilisieren (Richter, 1996). Photooxidativem Stress wird in der Pflanze u.a. mit Nichtphotochemischer Löschung (NPQ) begegnet, bei der die Gegenwart von Carotinoiden eine große Rolle spielt. Die Hauptform des NPQ wird als energieabhängige Löschung (qE) bezeichnet und ist von einem transmembranen pH-Gradienten abhängig (Briantais *et al.*, 1979), der durch das Proteine verändernde Agens DCCD blockiert werden kann. (Hoppe *et al.*, 1980). In Stress-Situationen bildet sich qE innerhalb von Minuten aus und ist genauso schnell reversibel (Horton *et al.*, 1996).

Bei überschüssiger Anregung der Photosysteme besteht die Gefahr der übermäßigen Reduzierung der Komponenten des photosynthetischen Elektronentransportes (Richter, 1996). Das kann beim Photosystem II zu geringerer Photosyntheseaktivität, der so genannten Photoinhibition, führen. Der Zerstörung des Photosystems wird aber durch einen erhöhten „turnover“ des D1-Proteins entgegengewirkt (Wilhelm, 1999).

Eine Konsequenz des Lichtstresses ist auf die vermehrte Bildung des reaktiven Chlorophyll-Triplettzustandes zurückzuführen, der mit Sauerstoff zu dem chemisch aggressiven Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) reagiert (Holzwarth, 1999). Carotinoide können den Triplettzustand des Chlorophylls sowie den $^1\text{O}_2$ wieder in den entsprechenden Grundzustand überführen. Das dabei entstehende angeregte Triplettcarotinoid gibt seine überschüssige Energie als Wärme ab (Wärmerelaxation). Im Schutzmechanismus des NPQ wird durch den transmembranen pH-Gradienten, der bei erhöhter Anregung des Photosystems II aufgebaut wird, die Synthese von Zeaxanthin aus Violaxanthin über das Zwischenprodukt Antheraxanthin ausgelöst (Richter, 1996; Müller *et al.*, 2001). Zeaxanthin bewirkt im LHC II letztendlich die Umwandlung von Excitonenenergie in Wärme. Eine weitere physiologische Reaktion auf Lichtstress ist die Mehler-Reaktion, auf die hier jedoch nicht näher eingegangen werden soll.

1.4. Die Cab-Proteinfamilie

Chlorophyll a/b-bindende Proteine gehören zu den häufigsten Proteinen der Erde. Dazu werden alle Chlorophyll a/b-bindenden Proteine der Thylakoidmembran gezählt, als bekanntestes Beispiel sei hier jedoch der LHC II näher erwähnt. Trimerer LHC II bildet den Hauptteil der Antenne, 50% des Chlorophylls der Thylakoidmembran liegt daran gebunden vor. Zu einer erweiterten *Cab*-Proteinfamilie wird neben den genannten Vertretern aufgrund von Sequenzähnlichkeit auch die hier näher untersuchte 22kD-Untereinheit des PS II, das PsbS-Protein (auch CP22), gerechnet (Funk *et al.*, 1994). Außerdem werden die Chlorophyll a/c-Proteine der Chromophyten (Paulsen, 1995; Green & Pichersky, 1994) sowie die „early light-inducible proteins“ (ELIPs, Green *et al.*, 1991) dazu gezählt. Die Funktion der Antennenkomplexproteine ist das photosynthetische Sammeln von Lichtenergie. Über die Funktion der Proteine der erweiterten *Cab*-Proteinfamilie ist jedoch nur wenig bekannt. Es wird vermutet, dass nicht das Sammeln von Licht ihre primäre Funktion gewesen ist, sondern vielmehr der Transport von Pigmenten oder eine Rolle als Schutzprotein bei Stress-Situationen (Montané & Kloppstech, 2000).

In dieser Arbeit wurden Proteine untersucht, die zur erweiterten *Cab*-Proteinfamilie gehören und eine Sequenzähnlichkeit zum LHC II aufweisen, sich aber v.a. durch die Länge und die Anzahl der transmembranen Bereiche von ihm unterscheiden. Das „one-helix-protein“ (OHP) und die „stress-enhanced proteins“ (Sep's) von *Arabidopsis thaliana* sind kurze Sequenzverwandte des LHC II mit einem bzw. zwei Membrandurchgangsbereich(en), die S-Untereinheit des Photosystems II (PsbS) zeichnet sich durch 4 transmembrane Bereiche aus. In den folgenden Abschnitten sollen die untersuchten Proteine etwas näher behandelt werden.

1.4.1. ELIPs - die “early light-induced proteins” in *Arabidopsis thaliana*

Die Familie der “early light-induced proteins” wird aufgrund von Sequenzähnlichkeiten der erweiterten *Cab*-Proteinfamilie zugerechnet (Green *et al.*, 1991). ELIPs stellen eine Gruppe kurzlebiger kerncodierter Proteine der Thylakoidmembran dar, die die Fähigkeit haben, bei Lichtstress stark innerhalb der Membranen höherer Pflanzen zu akkumulieren (Montané & Kloppstech, 2000; Montané *et al.*, 1997). Dagegen gehen die LHC-Level bei Lichtstress herunter, ein Mechanismus, der als erhöhter „turnover“ bezeichnet wird. Sie werden aber nicht notwendigerweise abgebaut, sondern evtl. räumlich umarrangiert (Montané & Kloppstech, 2000). ELIPs werden nur transient gebildet, beispielsweise während der Ergrünung etiolierter Keimlinge oder unter Lichtstress-Bedingungen (Adamska, 1997).

1. Einleitung

Die ELIP-Familie wird aufgrund der vorhergesagten Proteinstruktur in drei Gruppen unterteilt (Adamska, 2001), darunter 3-Helix-ELIPs, Proteine mit 2 Transmembrandomänen wie die „stress-enhanced proteins“ (Sep's) in *A. thaliana* (Heddad & Adamska, 2001), sowie Proteine mit nur einem Membrandurchgangsbereich wie das OHP (Jansson *et al.*, 2000), die Scp's (small *Cab*-like proteins) in Cyanobakterien (Dolganov *et al.*, 1995; Funk & Vermaas, 1999) und 1-Helix-HLIPs. Letztere werden zur Untergruppe der „high-light-induced proteins“ (HLIPs) gerechnet. Sowohl ELIPs als auch HLIPs weisen Sequenzhomologien zur ersten und dritten Helix der *Cab*-Proteine auf. Da sie konservierte Pigmentbindestellen beinhalten, wird von diesen Proteinen angenommen, dass sie, wie auch die *Cab*-Antennenproteine, Pigmente binden können. Ob diese Bindung transient oder dauerhaft stabil ist, oder ob die Proteine evtl. eine Funktion in der Photosynthese erfüllen, ist noch völlig ungeklärt.

Da ELIPs und HLIPs durch Lichtstress induziert werden, könnten sie das Reaktionszentrum schützen, indem sie überschüssige Energie ableiten. ELIPs und HLIPs treten sowohl in Cyanobakterien als auch in höheren Pflanzen auf (Montané & Klopstech, 2000). Da Cyanobakterien mit den Phycobilisomen jedoch unterschiedliche Lichtsammel-Systeme haben, wird vermutet, dass sich die Antennen zweimal unabhängig voneinander entwickelt haben könnten, und dass diese Entwicklung erst nach der Fähigkeit zur Ableitung der Energie begann. Die ELIPs und HLIPs wären dann unabhängig von der Antenne entstanden und ihre ursprüngliche Funktion wäre nicht das Einfangen von Licht, sondern der Schutz der Reaktionszentren.

1.4.1.1. OHP, das „one-helix protein“ aus *Arabidopsis thaliana*

Ein kurzes sequenzverwandtes Protein mit nur einem Membrandurchgangsbereich wurde von Jansson und Mitarbeitern in *Arabidopsis thaliana* beschrieben (Jansson *et al.*, 2000). Das „one-helix protein“ (OHP) weist Homologien zum LHC II, den ELIPs sowie dem PsbS auf, am größten ist die Ähnlichkeit jedoch zu den HLIPs von Cyanobakterien und Algen.

Als Vertreter der HLIPs ist das OHP ein durch Starklicht induziertes Protein. Auch hier kann unter solchen Stressbedingungen ein erhöhter „turnover“ beobachtet werden: der OHP-Level steigt an, während der LHC-Level absinkt. Das OHP wird als Vorläufer-Protein in den Chloroplasten transportiert und dabei in das mature Protein prozessiert. Der N-Terminus des inserierten Proteins wird nach der „positive inside rule“ (Gavel *et al.*, 1991) auf der stromalen Seite der Membran erwartet (Jansson *et al.*, 2000), da das Protein an der N-terminalen Seite der Transmembranhelix 3-4 positive Ladungen aufweist.

1. Einleitung

Das in dieser Arbeit untersuchte OHP besteht aus einem 110 Aminosäuren (AS) langen Vorläufermolekül und hat ein Molekulargewicht von ca. 14 kD. Das reife Protein weist 69 AS auf, hat ein Molekulargewicht von 7,4 kD und einen theoretischen isoelektrischen Punkt von 9,98 (EMBL, vgl. Anhang 7.2). In Abbildung 1.3 ist die Aminosäuresequenz von OHP dargestellt. Der dem LHC II homologe Sequenzabschnitt ist grün markiert. Die transmembrane Domäne ist durch Umrandungen angedeutet, das rote Kästchen bezieht sich auf die von Jansson und Mitarbeitern beschriebene Helix, das blaue Kästchen auf die durch Homologie-Modelling* vorhergesagte Helix. Die Helix des OHP weist Sequenzähnlichkeiten zur ersten und dritten Transmembrandomäne des LHC II auf. Das N-terminale Ende der Sequenz ähnelt einem Transit-Peptid. Obwohl es keine generelle Konservierung von Transit- oder Schnittstellen-Sequenzen gibt, sind die Aminosäuren 39-42 (VRAA) oft bei Schnittstellen von LHC-Proteinen zu finden.

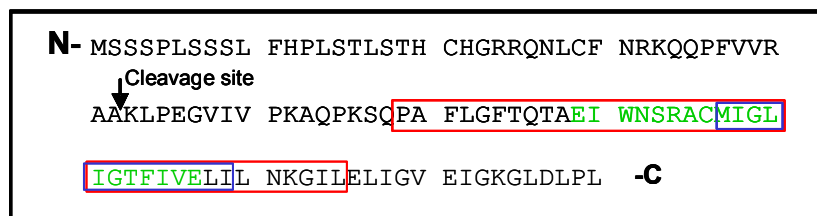


Abb. 1.3: Aminosäuresequenz des one-helix proteins (OHP) aus *Arabidopsis thaliana*. Grün dargestellt ist der homologe Bereich zum LHC IIb, die Kästchen deuten den möglichen transmembranen Bereich an: rot, nach Stefan Jansson (Jansson *et al.*, 2000); blau, nach der Strukturvorhersage von Thorsten Schweickardt.

Über die Funktion des OHP aus *Arabidopsis thaliana* ist noch fast nichts bekannt, es wird jedoch vermutet, dass es sich dabei um einen transienten Pigmentcarrier handeln könnte. Allerdings wird auch eine ständige Rolle in der Photosynthese nicht ausgeschlossen (Jansson *et al.*, 2000). Auch über die pigmentbindenden Eigenschaften des OHPs wird spekuliert. In der Mitte der ersten und der dritten transmembranen Helix von LHC II sind je zwei konservierte Pigmentbindestellen lokalisiert, die auch in HLIP-ähnlichen Proteinen wie dem OHP konserviert sind. Diese Pigmentbindestellen sind beispielsweise ein Glutaminsäurerest (Glu; E) in der ersten Helix, der mit einem Arginin (Arg, R) in der dritten Helix eine Ionenbindung bildet. Dies könnte evtl. auch ein Hinweis auf Dimerisierung zwischen zwei OHP- Molekülen oder einem OHP und einem anderen HLIP sein.

* Das Homologie-Modelling des OHP wurde von Thorsten Schweickardt im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Molekulare Biophysik, Universität Mainz, durchgeführt.

1. Einleitung

1.4.1.2. Scp's – „small Cab-like proteins“ in Cyanobakterien

Cyanobakterien weisen im Gegensatz zu höheren Pflanzen weder Chlorophyll b noch Multi-Helix *Cab*-Proteine auf. Umso erstaunlicher war es, als 1995 ein kurzes Protein mit nur einer Transmembranhelix in dem Cyanobakterium *Synechococcus* PCC 7942 beschrieben wurde (Dolganov *et al.*, 1995). Dieses *HliA* genannte Protein weist Sequenzähnlichkeit zur *Cab*-Proteinfamilie auf und seine Expression wird durch Starklicht kontrolliert. Auch in *Synechocystis* PCC 6803 wurden solche Proteine identifiziert (Funk & Vermaas, 1999). Ihre Expression wird jedoch nicht so signifikant durch Starklicht gesteuert wie *HliA*, daher wurden sie als „small Cab-like proteins“, Scp's, bezeichnet. Andere Stressbedingungen verursachen jedoch auch eine erhöhte Expression der Scp's, darunter beispielsweise Stress durch Stickstoff-Mangel (He *et al.*, 2001).

In *Synechocystis* PCC 6803 wurde eine Genfamilie identifiziert, die für fünf *Cab*-ähnliche Proteine mit nur einem Membrandurchgangsbereich codiert. Die Expressionsprodukte wurden ScpA-E genannt. Auch den Scp's werden pigmentbindende Eigenschaften zugeschrieben. Wie auch für das OHP wird vermutet, dass sie transiente Pigmentcarrier sein könnten (Funk & Vermaas, 1999). Sie sind in der Thylakoidmembran lokalisiert (Hao *et al.*, 2001) und können daraus in einer pigmentierten Bande aufgereinigt werden (Christiane Funk, pers. Kommentar). ScpC/D akkumulieren verstärkt in Mutanten, in denen das Photosystem I deletiert ist. Da diese Mutanten eine sechsfach geringere Chlorophyllmenge aufweisen als der Wildtyp, wird vermutet, die ScpC/D-Akkumulation sei an einen niedrigen Chlorophyllbedarf der Zelle gebunden. Eine Funktion dieser Proteine wäre dann die Bindung von überschüssigem Chlorophyll (Funk & Vermaas, 1999).

In dieser Arbeit wurde natives ScpC/D aus Thylakoidmembranen isoliert. Die Proteine ScpB-E sind 6-8 kD groß und zeigen Sequenzähnlichkeiten zur dritten Helix der *Cab*-Proteine. ScpA ist ein Fusionsprotein mit dem Enzym Ferrochelataase. In einer Kooperation mit Christiane Funk, Stockholm (jetzt Umeå), wurden rekombinante Scp's kloniert und überexprimiert, um sie dann *in vitro* mit Pigmenten zu falten.

1.4.1.3. Sep1 und 2 - „stress-enhanced proteins“ aus *Arabidopsis thaliana*

Die „stress-enhanced proteins“ (Sep) werden zur erweiterten Familie der *Cab*-Proteine gerechnet. Genauer gehören sie zur ELIP-Familie von stress-induzierten *Cab*-Proteinen in der Thylakoidmembran (Adamska, 2001). Wie für die ELIPs beschrieben, werden auch die Sep-Proteine durch hohe Lichtintensitäten induziert (Heddad & Adamska, 2000). Blätter, die Lichtstress ausgesetzt sind, zeigen einen

1. Einleitung

vier- bis zehnfachen Anstieg des Sep-Transkriptionslevels. Die für *Arabidopsis* identifizierten und beschriebenen Sep's sind kerncodierte Proteine. Für beide Proteine werden zwei transmembrane Helices angenommen (Heddad & Adamska, 2000). Zu der ELIP-Familie gehören zumeist Proteine mit drei Transmembrandomänen, aber auch ein-Helix-Proteine wie HLIPs, Scp's und OHP. Die zwei-Helix-Sep's (Bezeichnung nach Adamska, 2001) werden auch LILs genannt (Light-harvesting-like, nach Jansson *et al.*, 2000).

Als Vorläuferprotein hat Sep1 eine Länge von 146, Sep2 von 262 AS. Die maturen Proteine sind 103 und 223 AS lang. Die Größenunterschiede zwischen den Sep-Proteinen beruhen auf der unterschiedlichen Länge der hydrophilen N- und C-terminalen Regionen. Abgesehen von dem Größenunterschied beträgt auch die Sequenz-Ähnlichkeit unter den Sep-Proteinen nur ca. 25% (Adamska, 2001). Das beruht im Wesentlichen darauf, dass nur die erste Transmembranhelix konserviert ist, die zweite Helix sowie der N-Terminus sind polymorph. In Sep1 und Sep3 ist einer der beiden konservierten Glutaminsäure-Reste (E) durch einen Asparaginsäure-Rest (D) ersetzt. Zusätzlich sind konservierte Glycin (G)-, Threonin (T)-, und Leucin (L)- Reste in Helix 1 zu finden oder flankierend am ELIP-Konsensus-Motiv (Für Sequenzen, siehe Anhang 7.2). Der stromale N-Terminus von Sep1 enthält „myristoylation sites“, das sind Sequenzbereiche, an denen die C14-gesättigte Fettsäure Myristat kovalent angelagert werden kann (vgl. Anhang 7.2). Dadurch kann der N-Terminus über Lipide an die Membran gebunden werden und so einen zusätzlichen Liganden für die Chlorophyllbindung darstellen. Auch der stromale N-Terminus von Sep2 enthält ein paar „myristoylation sites“.

Das in dieser Arbeit untersuchte Sep1 setzt sich aus dem Vorläufermolekül mit 146 Aminosäuren und dem N-terminal angehängten Thioredoxin mit 120 Aminosäuren zusammen. Die Größe des Fusionsproteins entspricht 26,6 kD. Thioredoxine können chloroplastidäre Enzyme aktivieren, indem die Disulfidbrücken lösen. Sep2 ist kein Fusionsprotein und hat eine Größe von ca. 20 kD.

Auch zur Funktion der Sep's ist noch fast nichts bekannt. Im Allgemeinen erfüllen Mitglieder der ELIP-Familie Schutzfunktionen innerhalb der Thylakoide (1.4.1; Adamska, 2001). Das geschieht entweder durch Bindung von freien Chlorophyll-Molekülen und damit Verhinderung der Bildung freier Radikale oder/und durch Bindung der Pigmente des Xanthophyllzyklus und Teilnahme an der Wärme-relaxation. Weiter werden eine Rolle als transiente Pigmentcarrier oder Chlorophyll-Austausch-Funktionen nicht ausgeschlossen.

1. Einleitung

1.4.1.4. PsbS

Das PsbS, oder auch CP22, repräsentiert die S-Untereinheit des PS II. PsbS gehört zur erweiterten *Cab*-Familie, ist jedoch ein spezieller Fall innerhalb der *Cab*-Proteine, da es sich von den anderen Mitgliedern durch eine vierte transmembrane Helix unterscheidet (Funk, 2001). Das PsbS konnte nativ mit Chlorophyll a, b und Carotinoiden aufgereinigt werden (Funk *et al.*, 1995a). Da es jedoch in etiolierten Pflanzen ohne Pigment gefunden wurde (Funk *et al.*, 1995b), wird angenommen, dass PsbS auch in Abwesenheit von Pigmenten stabil und gegen Proteasen geschützt ist. Aus diesem Grund wird für das PsbS eine Rolle als transients Chlorophyll-carrier angenommen, wie sie auch für die verwandten ELIPs vermutet wird. Li *et al.* (2000) beschrieben eine Mutante von *A. thaliana*, der das *psbS*-Gen fehlt und die kein NPQ mehr betreiben kann. Diese Tatsache bekräftigt die Vermutung, die schon 1995 von Funk und Mitarbeitern aufgestellt wurde, dass PsbS eine Rolle im NPQ spielt.

Das aus 274 Aminosäuren bestehende PsbS-Vorläuferprotein setzt sich aus dem maturen Protein mit 205 und der Prä-Sequenz mit 69 Aminosäuren zusammen. Das in dieser Arbeit verwendete PsbS-Protein wurde von Claudia Büchel, Frankfurt, im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt und weist einen C-terminalen His-Tag auf. (Zur Aminosäuresequenz des PsbS, siehe Anhang 7.2) PsbS ist ein sehr hydrophobes Protein. Sein Pigmentgehalt ist mit 4-6 Chlorophyllen (Chlorophyll a/b = 6) und einem Carotinoid pro Protein (Funk *et al.*, 1995a) deutlich geringer als der des LHC II. PsbS kann über den „assisted SRP-pathway“, aber auch spontan in die Thylakoidmembran inseriert werden (Kim *et al.*, 1999). Es ist in der Peripherie des LHC II-PS II Superkomplexes lokalisiert, genauer als Bestandteil des flexiblen LHC II-Pools, der ihn mit dem Superkomplex verbindet (Nield *et al.*, 2000).

Über die Funktion des PsbS ist noch einiges unklar. Es wird über eine Rolle als transients Chlorophyllcarrier diskutiert, der neusynthetisierte Chlorophyllmoleküle absorbiert (Funk, 2001). Mit der Entdeckung, dass PsbS weder für das Sammeln von Lichtenergie noch für die Photosynthese allgemein eine Rolle spielt, sondern ein für das NPQ essentielles Protein darstellt (Li *et al.*, 2000), konnte eine mögliche Funktion identifiziert werden. Die genaue Rolle des Proteins in der energie-abhängigen Fluoreszenzlöschung, qE, bleibt aber noch ungeklärt.

1.4.2. Evolution der Chlorophyll a/b-bindenden Proteine

Der LHC II weist drei Transmembranhelices auf; sowohl in höheren Pflanzen als auch in Cyanobakterien wurden aber auch verkürzte Proteine mit Sequenz-ähnlichkeit zum LHC II gefunden, die nur einen oder zwei Membrandurch-

1. Einleitung

gangsbereiche haben. Beispiele für diese verkürzten Proteine wurden hier mit den 2-Helix-Sep's und dem OHP aus *A. thaliana* schon näher erwähnt. Als Vertreter mit 4 Helices wird auch das PsbS-Protein zur erweiterten *Cab*-Proteinfamilie gerechnet (Funk *et al.*, 1994). Da diese in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proteine Sequenzähnlichkeiten zueinander aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass sie einen gemeinsamen Vorfahren haben. Wie könnte die Evolution der *Cab*-Proteine abgelaufen sein?

Es wird vermutet, dass kurze Proteine mit einem Membrandurchgangsbereich, wie beispielsweise die 1-Helix-ELIPs, die Vorfahren der *Cab*-Antennenproteine sind (Green *et al.*, 1991; Green & Pichersky, 1994). Durch Fusion zweier für solche Proteine codierender Gene entstanden vermutlich zwei-Helix-Proteine (Abb. 1.4). Es ist wahrscheinlich, dass sich die Gene zweier unterschiedlicher 1-Helix-Proteine zusammengefunden haben, da in 2-Helix-ELIPs wie Sep1 und Sep2 die erste Transmembranhelix Ähnlichkeiten zum LHC II aufweist, die zweite Helix jedoch polymorph ist (Adamska, 2001). Wie aber entwickelten sich Proteine mit einer zusätzlichen dritten Helix wie der LHC II, wenn diese der ersten Helix homolog ist? Das PsbS mit seinen 4 Transmembrandomänen kann gewissermaßen als „missing link“ in der Evolution des LHC II betrachtet werden. Das codierende Gen entwickelte sich vermutlich durch interne Genduplikation zweier für 2-Helix-Proteine codierender Gene. Durch Deletion der vierten Helix entstand dann das 3-Helix-Protein.

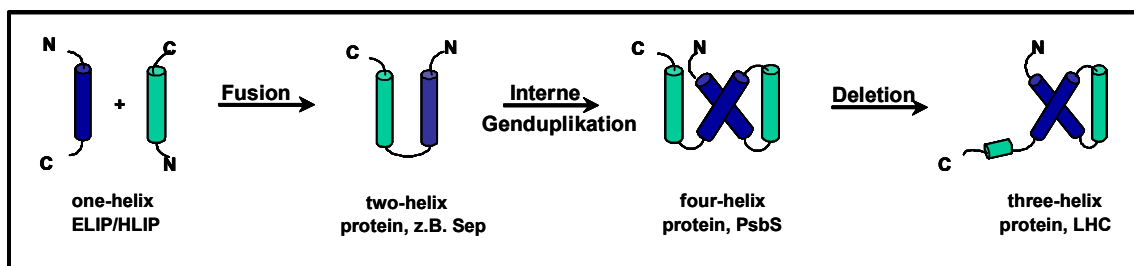


Abb. 1.4: Evolution der *Cab*-Proteine, mögliches Szenario.

LHCs und ELIPs waren ursprünglich vermutlich nicht primär für die Lichtsammlung zuständig, sondern eher für die Verteilung der Lichtenergie in Form von Wärme oder Fluoreszenz (Montané & Kloppstech, 2000). Diese Proteine leiten sich vermutlich von den ein-Helix HLIPs aus Cyanobakterien ab und entwickelten ausgehend davon zunächst ihre Schutzfunktion. Die Proteine der Lichtsammelkomplexe, LHC I und II, wären als Weiterentwicklung der ELIPs anzusehen, ihre Funktion damit eine Spezialisierung oder Anpassung an veränderte Umweltbedingungen.

1.5. LHC II

Der Lichtsammelkomplex des Photosystems II, LHC II, ist die Hauptkomponente der peripheren Antenne. Der LHC II wurde kristallisiert und seine Struktur mittels Elektronenmikroskopie mit einer Auflösung von 3,4 Å aufgeklärt (Kühlbrandt *et al.*, 1994). Der native LHC II ist in Trimeren organisiert. Der kerncodierte, vorwiegend in den Grana-Thylakoiden lokalisierte Komplex weist neben den drei Transmembranhelices eine vierte, kurze amphiphile Helix am C-Terminus auf, die sich in der Interphase zwischen der hydrophoben Membran und dem Lumen befindet.

1.5.1. Rekonstitution des LHC II

Zur Analyse von pigmentbindenden Proteinen ist die Möglichkeit, sie *in vitro* quasi in ihren nativen Ausgangszustand zurückzufalten, von großer Bedeutung. Zur Rekonstitution von Membranproteinen sind Detergentien notwendig, um die hydrophoben Proteine und Pigmente in Lösung zu halten. Manche Membranproteine können außerdem direkt in Lipidvesikel rekonstituiert werden (Booth *et al.*, 1997; Booth, 2000). Für den LHC II existieren verschiedene Methoden, mit denen die pigmentabhängige Faltung erreicht werden kann. Rekombinantes LHC IIb wurde 1990 erstmals kloniert und überexprimiert. Es konnte *in vitro* durch mehrere Frier-Tau-Zyklen (nach Plumley & Schmidt, 1987) mit Pigmenten in seinen funktionellen Zustand rekonstituiert werden (Paulsen *et al.*, 1990). Seine spontane Selbstorganisation *in vitro* ist außerdem abhängig von der Gegenwart von Pigmenten (Paulsen *et al.*, 1993). Der LHC II bindet pro Monomer 12 Chlorophylle (7 Chl a, 5 Chl b) und 2 Luteine. Außerdem wurde pro Trimer ein Neoxanthin beschrieben (Croce *et al.*, 1999) Die derzeit verwendete Standardrekonstitution des LHC II erfolgt durch einen Detergenswechsel. Für kinetische Faltungsstudien wird eine Rekonstitution durch Verdünnung aus SDS mit einem nicht-ionischen Detergens verwendet, die an die „Rapid-Mixing“-Rekonstitution angelehnt ist (Booth & Paulsen, 1996; Horn & Paulsen, 2002). Alle bislang verwendeten Rekonstitutionsmethoden gehen von in SDS gelöstem, denaturiertem Protein aus. In diesem Detergens ist das LHC II jedoch schon zu einem gewissen Grad gefaltet, was mittels CD-Spektroskopie anhand der Helixbildung gezeigt werden konnte (Horn & Paulsen, 2002). LHCP kann aber auch aus komplett denaturiertem Zustand in einen funktionellen Protein-Pigment-Komplex rekonstituiert werden. Zur vollständigen Denaturierung des Proteins dient hier das chaotrope Agens Guanidinium Hydrochlorid (Yang *et al.*, 2003).

1. Einleitung

1.5.2. Import- und Insertionswege

Da im Rahmen dieser Arbeit Versuche zum Import von Proteinen in Chloroplasten bzw. zur Insertion in Thylakoide durchgeführt wurden, soll im Folgenden ein kurzer Überblick über die Import- und Insertionswege gegeben werden. Kerncodierte Proteine wie der LHC II müssen nach ihrer Synthese im Cytoplasma zu den Orten ihrer Funktion transportiert werden. Zum Eintritt in verschiedene Kompartimente werden abspaltbare Transitsequenzen benötigt, die notwendig und ausreichend für die Translokation des Vorläuferproteins in den Chloroplasten sind (Caliebe & Soll, 1999). Die Hauptbestandteile des Translokationskomplexes sind die Toc- und Tic-Proteine (Translocon at the outer/inner chloroplast envelope). Sie erkennen die Zielsteuerung des zu transportierenden Proteins und bilden auch die eigentlichen Translokationsporen. Nach dem Durchtritt des Proteins durch die Hüllmembranen wird die Transitsequenz von stromalen Peptidasen abgespalten. Das mature Protein wird dann im Falle des LHC II weiter durch das Stroma in die Thylakoidmembran transportiert (Vgl. Abb. 1.5 für einen schematischen Überblick).

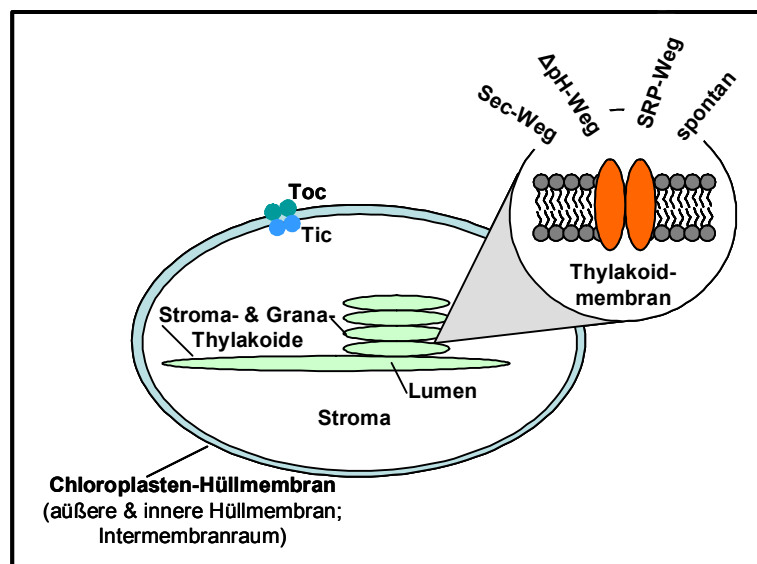


Abb. 1.5.: Import- und Insertionswege - Schematische Übersicht.

Bislang sind vier unterschiedliche Translokations-Mechanismen bekannt, die einen Transport von Proteinen in die Thylakoidmembran oder das Lumen bewerkstelligen. Lumenale Proteine werden über den ATP-abhängigen Sec-Weg, der Ähnlichkeiten zum bakteriellen Sekretionssystem (Sec) aufweist, durch die Membran transportiert oder über den ΔpH -Weg, der vom thylakoidalen Protonengradienten getrieben wird (Cline *et al.*, 1992). Der LHC II gelangt wie alle photosynthetischen Lichtsammelproteine über den SRP-Weg (Signal Recognition Particle) in die Thylakoidmembran (Li *et al.*, 1995; für Übersicht, vgl. Woolhead *et al.*, 2000). Die Insertion ist aber neben dem SRP noch an Faktoren wie den Energielieferant GTP und den GTP-bindenden cpFtsY gebunden. Die dem LHC II

1. Einleitung

verwandten Proteine PsbS und ELIP-2 können über den SRP-Weg, aber auch spontan in die Thylakoidmembran inseriert werden (Kim *et al.*, 1999).

1.6. Wasserlösliche, chlorophyllbindende Proteine höherer Pflanzen

Vor dem Hintergrund, dass die bisher erwähnten chlorophyllbindenden Proteine höherer Pflanzen ausnahmslos Membranproteine sind, ist es von besonderem Interesse, dass vor 40 Jahren ein wasserlösliches Protein entdeckt wurde, das ebenfalls in der Lage ist, Chlorophyll zu binden. Das wasserlösliche Chlorophyllbindende Protein (WSCP, Water Soluble Chlorophyll Protein), wurde erstmals 1963 von Yakushiji und Mitarbeitern in Blättern des weißen Gänsefußes, *Chenopodium album*, beschrieben (Yakushiji *et al.*, 1963). Die Entdeckung war der Anlass, auch in anderen Pflanzen nach ähnlichen Proteinen zu suchen. Verwandte Proteine wurden in der virginischen Kresse (*Lepidium virginicum* L.), im Blumenkohl (*Brassica oleracea* var. *botrys* L.) und anderen Kreuzblütlern wie z.B. Raps (*Brassica napus*, L.) gefunden.

Biochemische Charakterisierung des nativen WSCP aus Blumenkohl und aus *Lepidium* (Murata *et al.*, 1971; Sugiyama und Murata, 1978; Murata *et al.*, 1981) führte zu einer Einteilung der WSCPs in 2 Klassen: Klasse I beinhaltet Proteine, bei denen lichtabhängige Absorptionsänderungen beobachtet werden konnten. Zu Klasse II zählen die so genannten „non photoconvertible WSCPs“, die von der Pflanze unter Stress gebildet werden und ihre Absorption bei Lichteinstrahlung nicht ändern (vgl. Satoh *et al.*, 2001). Ein weiterer Unterschied zwischen den WSCP-Klassen liegt in der N-terminalen Sequenz (Kamimura *et al.*, 1997). Die Abbildung 1.6 fasst diese Einteilung nochmals zusammen.

Innerhalb der Klasse II unterscheidet man nach Chlorophyll-Bindung nochmals in zwei Untergruppen, die erste beinhaltet Blumenkohl (*Brassica oleracea* var. *botrys*), Rosenkohl (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) sowie wilden Senf (*Sinapis arvensis*) mit einem Chl a/b-Verhältnis von 6-10. Die zweite Klasse zeichnet sich durch ein weit geringeres Verhältnis von 1-2 aus und hierfür ist WSCP aus der virginischen Kresse, *Lepidium virginicum*, beschrieben.

Nishio und Satoh beschrieben ein weiteres homologes Protein in Raps, BnD22, das durch schnellen oder fortgeschrittenen Wasserstress sowie Salzstress induziert wird (Nishio & Satoh, 1997). BnD22 ist außerdem ein Mitglied der Familie der Protease-Inhibitoren vom Kunitz Typ (Downing *et al.*, 1992, Reviron *et al.*, 1992, Lopez *et al.*, 1994).

1. Einleitung

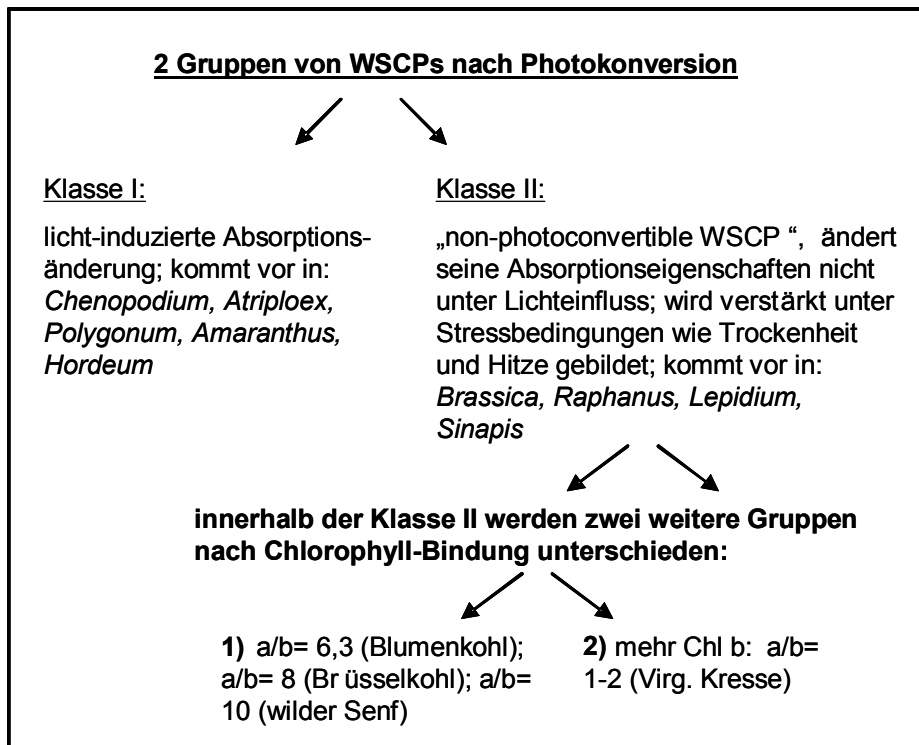


Abb. 1.6.: Übersicht über die bisher beschriebenen WSCP-ähnlichen Proteine.

In Abbildung 1.7 ist ein Sequenzvergleich des WSCPs aus Blumenkohl mit dem anderer Spezies dargestellt. Darin sind Aminosäuren, die nicht mit dessen Sequenz übereinstimmen, rot dargestellt. Verglichen wurden nur die Bereiche der maturen Proteine (blau). Man sieht deutlich, dass die WSCP-Sequenzen aus Blumenkohl und Raps eine sehr große Ähnlichkeit zueinander aufweisen. Unter den Sequenzen anderer Brassicaceen ist die von *Lepidium* am wenigsten homolog zum WSCP aus Blumenkohl. Das konservierte Motiv der Proteinasen vom Künitz-Typ ist in allen hier aufgeführten Vertretern präsent, ebenso das [F/Y]DPLGL-Motiv, welches innerhalb der *Cab*-Proteinfamilie konserviert ist.

	Motiv der Künitz-Proteinasen	[F/Y]DPLGL-Motiv der <i>Cab</i>-Proteine
WSCP Blumenkohl	1 MKTFFLVTL...AAVCTHGREQVDSNGNPVKRGAQYFIQPAK--SN-GGGLVPAAINIL---PFPC-LGITQ	66
WSCP Raps	1 MKTFFLVTL...AAVCTHGREQVDSNGNPVKRGAQYFIQPAK--SN-AGGLVPAAINLL---PFPC-LGITQ	66
P22 Rettich	1 LEVVDKSDNGNPVVRGAQYFIQPVKTESKNGGGLVPAAINL---PFPC-LGITQ	50
WSCP Arabidopsis	1 MKNPSVISFLIILLFAATICHTHNEPVKDTAGNPLNTRQYFIQPVKTESKNGGGLVPAAITVL---PFPC-LGITQ	73
WSCP Rübsen	1 MMSFFLVSEFLITLMLASRVCTHGENRVDTDGNPLRTAQYLLPLSPRSN-GGGLVPAANLV---PLCP-LGISQ	73
WSCP Lepidium	1 INDEEPVVDKDTNGNPLKLETTRYFIQPAS--DNNGGGLVPAANVD--LS---HLCP-LGIVR	51
WSCP Blumenkohl	67 TLLPYQPLVPSFGYEPVIVGTDYIYTSTTINIEFRSEIWPVCNELSKLWAVDVSSAAKEPAIIIGGERTAPNS----LFK	144
WSCP Raps	67 TLLPYQPLVPSFGYEPVIVGTDYIYTSTTINIEFRSEIWPVCNELSKLWAVDVSSAAKEPAIIIGGERTAPNS----LFK	144
P22 Rettich	51 TLLPYQPLVPSFGYHPNILGRDITIDTSANINIEFRSP IWPVCNEFSKLWAVD--SSASNEPAVIIGGEPKSPNS----AFK	127
WSCP Arabidopsis	74 TLLPYQPLVPSFVLALGV--GSTVMTSSA--VNIEFKN IWPFCKEFSKFWVVDSSSAFKEPSILIGGKMGDRNS----SFK	149
WSCP Rübsen	74 SSVKALTGLVPSFSYPYAIMDTYVNEMEA--INIEFKSDAWPGCEFSKYWEVDESSASEEPAVLVGGKSTERNs----WFR	150
WSCP Lepidium	52 TSLPYQPLVPTISTPSSSEGNVDL--TNTNIAITFDAPIW--LCPS--SKTWIVD--SSS--EEKYIITGGDPKSGES----FFR	123
WSCP Blumenkohl	145 IEAA---TGAHTYKLTTSSTGVTGIPG----PWLGAQLIATNDDAKTLFV-KFVKVDDDATKATTTSTRVEKGLGRMFFPY	218
WSCP Raps	145 IEAA---TEANTYKLTTSYGTGVTIPG----PWLGAQLIVTNDSEKTLFV-KFVKVDDAATKATTTSTRVEKGLGRMFFPY	218
P22 Rettich	128 IEKA---AGAHYKLTTSSTGVTGTPG----AWLSAPQLLVNDVAKTLFV-KFVKVDDATATTTSTRVEKGLGRMFFPY	201
WSCP Arabidopsis	150 IEKAGEGARANVYKLTTFYGTGVAIPG----VWLSAPQLLITKDTAKTLV-KFKKVD--DATATSNLYFPG	215
WSCP Rübsen	151 IERKEPFYGGVAYKLTTLTGTIGTVPG----PLGAQPLVLTNDDCETSLHFRFIVHGDTP--ATTS--ROEKLGRMFFPY	225
WSCP Lepidium	124 TEKY--GNGKNTYKLVRYDNGEGKSVGSKTSLWG--PAT.VLNDDDSDENA--PPTKFRVDTSKGVSFK--KSSLRMFFPY	197

Abb. 1.7: Sequenzvergleich des WSCPs aus Blumenkohl mit homologen Proteinen anderer Pflanzen. Blau dargestellt ist der verglichene Sequenzabschnitt der maturen Proteine. Rote Markierungen zeigen Unterschiede zum Blumenkohl-WSCP an. Modifiziert nach Satoh *et al.*, 2001.

1. Einleitung

1.6.1. Das WSCP aus *Brassica oleracea* var. *botrys*

Das „non photoconvertible“ WSCP der Klasse II aus *Brassica oleracea* var. *botrys* (Blumenkohl), ist ein Hauptgegenstand dieser Arbeit. Es wurde erstmals 1971 von Murata und Mitarbeitern beschrieben. Physikochemische Charakterisierung ergab ein Molekulargewicht des nativen Proteins von ca. 78 kD sowie einen Isoelektrischen Punkt von 4,6 (Murata *et al.*, 1971). Das native WSCP aus Blumenkohl enthält Chl a und b im Verhältnis a/b =6:1, es bindet jedoch keine Carotinoide (Murata *et al.* 1971). Nach Aufreinigung konnte das nach Extraktion der Pigmente erhaltene Apoprotein sowohl mit Chlorophyll a als auch mit Chlorophyll b wieder in seinen Ausgangszustand zurückgefaltet werden. (Zur Sequenz des WSCP, siehe Anhang 7.2)

Obwohl das unter Brassicaceen weit verbreitete WSCP in den letzten Jahren biochemisch und spektroskopisch charakterisiert worden ist (Murata *et al.* 1971, 1978), ist noch nichts bekannt über seine mögliche Funktion im Pflanzengewebe. Aufgrund des konservierten Bereiches der Kunitz-Typ-Proteinaseinhibitoren nahm man an, WSCP könnte eine wichtige Rolle im Stoffwechsel der Pflanze spielen, beispielsweise in proteolytischen Abbauwegen. WSCP aus Blumenkohl inhibiert jedoch kein Trypsin (Nishio und Satoh, 1997). WSCP könnte möglicherweise ein Regulator proteolytischer Wege in wassergestressten Blättern sein (Downing *et al.*, 1992; Ilami *et al.*, 1997; Kamimura *et al.*, 1997), oder eine proteaseinhibitorische Funktion in trockenadaptierten Blättern ausüben und damit eine Verzögerung der Seneszenz hervorrufen.

Da WSCP ein wasserlösliches Protein ist, das Chlorophylle zu binden vermag, wurde angenommen, dass es sich hierbei um einen Chlorophyllcarrier handelt, der am ersten Schritt des Chlorophyll-Abbaus, der Entfernung des Pigmentes aus der Thylakoidmembran, beteiligt ist (Murata *et al.*, 1981; Kamimura *et al.*, 1997). Ein solcher Carrier könnte aber auch in der Synthese von Chlorophyll eine Rolle spielen. Hörtensteiner beschrieb einen bislang unbekanntem „Faktor X“ im Chlorophyll-Syntheseweg, der den Transport des Chlorophyllides von der Chloroplasten-Hüllmembran hin zur Thylakoidmembran gewährleistet (Hörtensteiner, 1999).

Satoh und Mitarbeiter klonierten erstmals das WSCP aus Blumenkohl und exprimierten es als Fusionsprotein mit dem Maltosebindenden Protein MBP aus dem Maltose /Maltodextrin-Transporter von *E. coli* (Satoh *et al.*, 1998). Das rekombinante MBP-WSCP konnte mit isolierten Pigmenten rekonstituiert werden und war außerdem in der Lage, Pigmente aus zugesetzten Thylakoiden zu entfernen. Nach Rekonstitution des MBP-WSCPs zeigte sich eine Multimerbildung, hauptsächlich traten pigmentierte Tetramere auf (Satoh *et al.*, 1998). Des Weiteren verglichen Satoh und Mitarbeiter das rekonstituierte MBP-WSCP mit

nativem, aus Blumenkohlblättern isoliertem Protein. Es zeigten sich nahezu identische spektroskopische Eigenschaften (Sato *et al.*, 1998).

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Proteinen, die eine Sequenzähnlichkeit zum Hauptlichtsammelkomplex des Photosystems II höherer Pflanzen aufweisen. Es handelt sich zum Einen um Proteine der Thylakoidmembran, die der erweiterten *Cab*-Proteinfamilie zugerechnet werden, zum Anderen um ein wasserlösliches chlorophyllbindendes Protein (WSCP).

Die untersuchten Vertreter der *Cab*-Proteine, bei denen eine Pigmentbindung bislang nur vermutet wird, sind OHP, das „one-helix-protein“, sowie Sep1 und Sep2, die „stress-enhanced proteins“ aus *Arabidopsis thaliana*, und die „small Cab-like proteins“ ScpC & D aus *Synechocystis* PCC 6803. Die S-Untereinheit des Photosystems II, PsbS, weist vier Transmembranhelices auf. Seine Pigmentbindung wird kontrovers diskutiert. Über die biologische Funktion dieser Proteine ist noch sehr wenig bekannt.

Bei ScpC & D sollten Pigmentanalysen der nativen Proteine Hinweise auf möglicherweise gebundene Pigmente liefern, um im Rahmen einer Kooperation mit Christiane Funk, Umeå, geplante Rekonstitutionsversuche mit den rekombinanten SCPs zu erleichtern. In Rekonstitutionsversuchen von OHP, Sep1 und 2 sowie PsbS sollten die Vermutungen über die Pigmentbindung überprüft werden. Ausgehend davon sollte bei erfolgreicher Rekonstitution zunächst der Frage nachgegangen werden, wie stabil Pigmente von Proteinen gebunden werden können, die sich in der Tertiärstruktur so offensichtlich von dem 3-Helix-Antennenprotein LHC II unterscheiden. Außerdem sollte in dem Zusammenhang auch der Frage nachgegangen werden, ob die Pigmente evtl. transient und/oder lockerer an das jeweilige Protein gebunden werden. Durch Analyse der pigmentbindenden Eigenschaften sowie Identifikation der gebundenen Pigmente sollten schließlich Rückschlüsse auf mögliche Funktionen der Sequenzverwandten des LHC II gezogen werden. Eine weitere längerfristig interessante Fragestellung bezieht sich darauf, mögliche Chlorophyll-bindende Proteinmodule zu identifizieren, die im Design neuer funktioneller Chlorophyll-Proteine Verwendung finden könnten.

Neben den in der Thylakoidmembran lokalisierten *Cab*-Proteinen wurde in dieser Arbeit auch ein wasserlösliches chlorophyllbindendes Protein (WSCP) untersucht, das nur eine kurze homologe Sequenz zum LHC II aufweist. Das erste Ziel der Arbeit war das Einfügen eines Hexahistidylrestes und die anschließende bakterielle Überexpression des rekombinanten WSCP-his. Nach Bestätigung der Pigmentbindung des neuen Klons sollte dieser zunächst sowohl biochemisch als auch

spektroskopisch mit dem nativen Protein aus *Brassica oleracea* var. *botrys* verglichen werden. Anschließend sollten Experimente zur Pigmentbindung des Proteins eine nähere Aussage bezüglich seiner Funktion *in vivo* ermöglichen. Einen weiteren Beitrag dazu sollten Rekonstitutionsversuche mit Pigment-Derivaten sowie Untersuchungen zur Stabilität des WSCP leisten.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte und Chemikalien

2.1.1. Geräte

Absorptions-Spektrometer

- Shimadzu UV-2101PC, UV-VIS-Scanning Spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan
- Shimadzu MPS 2000, Shimadzu, Kyoto, Japan
- V-550, UV-VIS Spectrophotometer, Jasco Labor- und Datentechnik GmbH Deutschland, Groß-Umstadt
- Mikrotiterplatten-Lesegerät: SPECTRAMaxPLUS, Molecular Devices, Sunnyvale, California; Software: SOFTmax[®]PRO

Autoklav

- Varioklav Typ 500 Dampfsterilisator, H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, München

CD-Spektropolarimeter

- Spektropolarimeter Model J-810-S, Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt
 - Peltier-Element: Model CDF-426S/426L
 - Software: SpectraManager, Version 1.6

Fluoreszenz-Spektrometer

- Fluoromax-2, Jobin Yvon, Grasbrunn, Deutschland
 - Photomultiplier: R928, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee
 - Software: Datamax Software Version 2.24/Grams 32
 - Kühlung: Digital Thermostat Ministat Compatible Control, Huber Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg-Elgersweiler

Gelelektrophorese

- Gel-Gieß- und Elektrophoreseapparatur: Midget-Systems, Pharmacia LKB, Schweden
- Spannungsquelle: BioRad Power Pac 3000, Hercules, USA; Kühlung: Haake G, Haake D1

HPLC

- Analytische HPLC, Kontron Instruments, Neufahrn
 - Gradientenmischer: Model 425
 - Pumpe: Model 420
 - Detektoren: SPD-6AV, Shimadzu, Kyoto, Japan

Diodenarray Detektor 440

- Vorsäule: LiChrospher RP-8; 5 µm; 20 x 4,6 mm, Mainzer Analystechnik, Mainz
- Säule: Inertsil C8; 5 µm; 150 x 4,6 mm, Mainzer Analystechnik, Mainz
- Analytische HPLC Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt
 - Gradientenmischer: LG-1580-04 Quaternay Gradient Unit
 - Pumpe: PU-1580 Intelligent Pump
 - Degasser: DG-1580-53, 3-Line-Degasser
 - Detektor: MD-1515 UV/VIS-Intelligent Multiwavelength-Detector
 - Säule: Chromolith SpeedROD, RP-18e 50-4,6
 - Spannungsgeber: LC-Net II/ADC
 - Software: Jasco-PDA, BORWIN; Version 1.5
- Präparative HPLC Gynkotec
 - Pumpen: Model 510, 501 (Waters Millipore GmbH, Eschborn)
 - Interface: System Interface Module
 - Säule: Waters Bondapak C 18, 125 A, 10 µm 30 x 300 mm
 - Software: Max 820 Waters
 - Detektoren: Absorption GAT LCD 500 (Gamma Analysen Technik GmbH, Bremerhaven); Fluoreszenz Shimadzu RF 535 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)

Inkubationsschüttler

- Certomat H/B, Braun Biotech International, Melsungen

Magnetrührer

- IKA-Magnetrührer RCH, IKA Staufen
- IKAMAG® KMO2 basic, IKA Staufen

Mixer

- Heavy Duty Blendor, Blendor Waring, USA

pH-Meter

- Labor pH-Meter Serie 500, Krick Elektronische Messgeräte, Berlin
- InoLab pH Level 2, WTW GmbH, Weilheim

Reinstwasseranlage

- Optilab-Standard, membraPure, Lörzweiler

Rotationsverdampfer

- Rotovapor RE111, Büchi, Flawil, Schweiz

Schüttler

- Phero-Shaker, Biotech-Fischer, Reiskirchen

Speed-Vac

- Vacuum Concentrator, Bachofer, Reutlingen

Sterilbank

- Laminar Flow, SLEE Semiconductor Technik GmbH, Mainz

Thermocycler

- Cycler Primus 25, MWG Biotech, München

Tischrührgerät

- MS2 Mini-Schüttler, IKA-Works Inc., Wilmington, USA
- Vorex Genie2, Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA

Ultraschallbad

- SONOREX super, RK 102H, Bandelin, Berlin

Versa Doc Imaging System

- Model 3000, Biorad, München; Software: Quantity One

Waagen

- BP 2100S, Sartorius AG, Göttingen
- Analytik A200S, Sartorius AG, Göttingen

Wärmeschrank

- Memmert, Schwalbach

Wasserkocher

- HB4 basic, IKA Labortechnik, Staufen

Wasserbäder

- Heizwasserbad: Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
- GFL® Schüttelwasserbad 1083, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel

Zellaufschluss-Pressen

- French® Pressure Cell Press, SLM Aminco, SLM Instruments, Inc.

Zentrifugen

- Tischzentrifugen
 - Hettich Mikro 12-24 und Mikro 24-48, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
 - Bachofer Tischzentrifuge, Bachofer, Reutlingen
 - Hettich Kühlzentrifuge Universal 30RF; Rotoren 1412 (r=92 mm), 1414 (r= 94 mm)
 - Beckman präparative Kühlzentrifuge, Modell J2-21, Beckman, München; Rotoren JLA 10500, JA 20, JS 13.11
 - Beckman GPR Centrifuge; Rotor GH 3.7, Beckman, München
- Ultrazentrifugen
 - Beckman Optima XL-100K, Class S Ultrazentrifuge, Beckman, München
 - Centrikon T-1065, Kontron Instruments, Neufahrn
 - Rotoren: Beckman SW60Ti

Formeln zur Umrechnung von Drehzahl und relativer Zentrifugalbeschleunigung:

$$RCF = (RPM / 1000)^2 \times r \times 1,118$$

$$RPM = \sqrt{RCF / r \times 1,118} \times 1000$$

2.1.2. Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien bei folgenden Herstellern in p.A. Qualität bezogen: Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg; Biomol, Hamburg; Boehringer, Mannheim; Macherey-Nagel, Düren; Merck eurolabs (ab 2002 VWR International GmbH, Frankfurt); New England BioLabs[®] Inc., Frankfurt; peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen; Serva, Heidelberg; SIGMA-Aldrich, Deisenhofen; und Stratagene, Amsterdam.

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Prinzip und Ziel der Klonierung von WSCP-his

Für einen Teil der vorliegenden Arbeit wurden Experimente mit dem wasserlöslichen chlorophyllbindenden Protein aus Blumenkohl (WSCP) durchgeführt. Dazu wurde uns von Prof. Satoh (Toho University, Chiba, Japan) ein Fusionsprotein zur Verfügung gestellt, das sich aus WSCP und dem Maltosebindenden Protein MBP zusammensetzt. (MBP-WSCP = **M**altose **B**inding Protein N-terminal vom **W**ater **S**oluble **C**hlorophyll **P**rotein). Das codierende Gen für MBP-WSCP lag in dem Vektor pMAL-cRI (New Engl. Biolabs) vor.

MBP, oder auch MalE genannt, ist Teil des Maltose/Maltodextrin Systems in *E. coli* und somit beteiligt an Aufnahme und Umsetzung von Maltodextrinen. Das lösliche MBP hat eine Größe von 44 kD und macht somit den Hauptanteil des Fusionsproteins aus. Zu Beginn der Versuche wurde mit dem Fusionsprotein gearbeitet. Das rekonstituierte WSCP sollte jedoch spektroskopisch sowie auf seine pigmentbindenden Eigenschaften hin untersucht werden. Um eine Störung des MBP-Teils zu verhindern, sollte für weiterführende Experimente eine Umklonierung vorgenommen werden. Ziel dieser Umklonierung war es, den WSCP-codierenden Bereich aus dem Klon herauszuholen, mit einem Hexahistidylrest (His-Tag) zu versehen und in den Vektor pDS12/RBSII einzufügen. Der Vektor pDS12 wurde gewählt, da das Überexpressionsprotokoll für Proteine in diesem Vektor etabliert ist und die Chance auf effiziente Überexpression somit als recht groß eingeschätzt wurde. Der Hexahistidylrest schließlich wurde eingefügt, um eine einfache Reinigung des Proteins sowie möglicher Protein-Pigment-Komplexe zu ermöglichen.

2.2.2. Ausgangsklone

Der Ausgangsklon bestand aus dem pMAL-cRI Vektor und einem Insert, das die codierende Region für das MBP-WSCP Fusionsprotein trägt. Die WSCP-Sequenz wird von EcoRI- und HindIII-Schnittstellen flankiert. Sie sollte bei der Klonierung als Insert dienen.

Für den Vektor wurde der Lhcb1-Klon D7f.3 verwendet (Dilly-Hartwig *et al.*, 1998). Das Plasmid setzt sich zusammen aus dem Vektor pDS12 und dem in der multiple cloning site liegenden *cab*-Gen AB80. Die Expression des LHCP ist über das vorgeschaltete *lac*-Operon mit IPTG induzierbar. Außerdem enthält das Plasmid ein β -Lactamase-Gen, was für die Ampicillinresistenz der induzierten Bakterien sorgt.

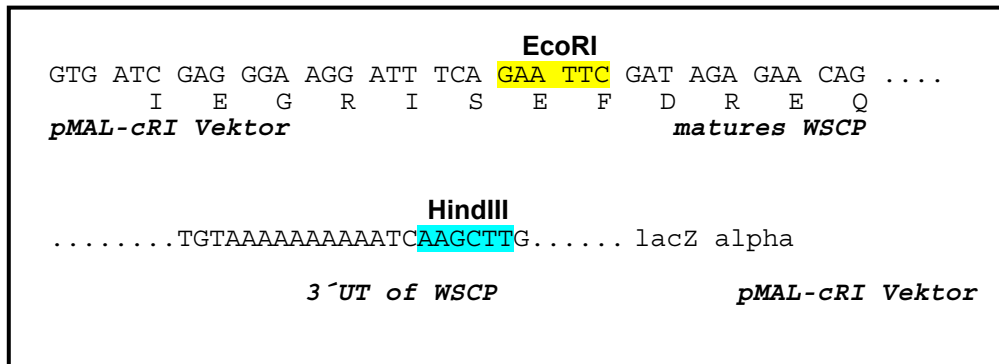


Abb. 2.1.: Teile der Nucleotidsequenz des WSCP-Ausgangsklons (Nach Satoh). Das für das mature WSCP codierende Gen liegt in dem Vektor pMAL-cRI und wird von einer EcoRI-Restriktionsstelle (5'Ende) und einer HindIII-Stelle (3'Ende) flankiert.

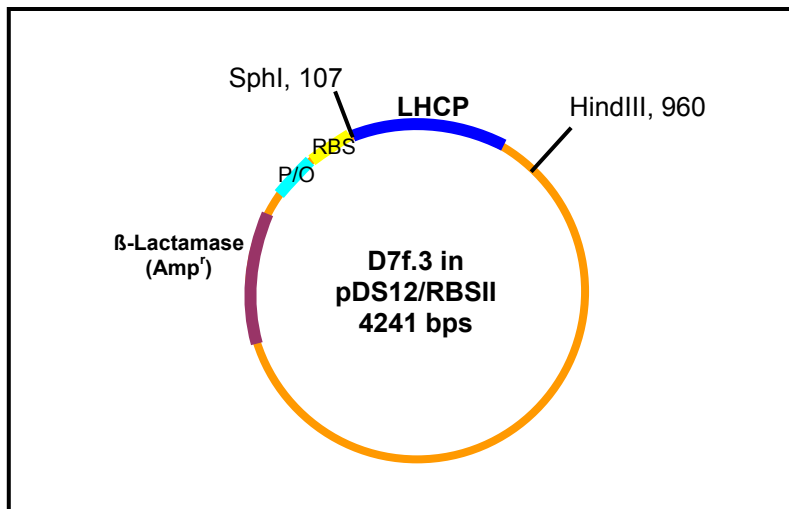


Abb. 2.2: Schematische Übersicht über den Expressionsklon für das mature LHCP, D7f.3 (Dilly- Hartwig, 1998). Der Vektor pDS12 kodiert für das Gen lhcb-1 und trägt eine Ampicillin-Resistenz. Das lhcb-1-Gen weist eine SphI-Restriktionsstelle am ATG Translationsstart sowie eine SacI-Stelle hinter dem 11. Codon auf. Außerdem liegt in der multiple cloning site u.a. eine HindIII-Stelle, die für die Klonierung eine Rolle spielte. P/O, Promotor (Phage T₅-Promotor P_{N25})- und Operator (*E. coli* Lac-Operator)-Region; RBS, Ribosomenbindestelle.

2.2.3. Klonierungsstrategie

Aus dem für das MBP-WSCP Fusionsprotein codierenden Klon wurde mit den Restriktionsendonucleasen EcoRI und HindIII der für das WSCP codierende Bereich herausgeschnitten (vgl. Abb. 2.1). Dieser sollte als Insert in den Vektor pDS12 eingefügt werden. Der Vektor wurde durch Restriktionsverdau mit SphI und HindIII aus dem Expressionsklon für das mature AB80-Protein gewonnen (vgl. Abb. 2.2). Der Hexahistidylrest wurde über ein synthetisches Oligonucleotid (siehe 2.2.4.1) eingefügt. Vektor, WSCP-Sequenz und Oligonucleotid wurden ligiert und der resultierende Klon WSCP-his codiert für das mature WSCP mit N-terminal angehängtem His-Tag. Der Klon wurde mittels Sequenzierung (vgl. 2.2.16) auf Präsenz des His-Tags sowie auf Mutationen hin überprüft. Ein Test auf erfolgreiche Überexpression erfolgte mit einer Induktion im Mini-Maßstab (vgl. 2.2.14).

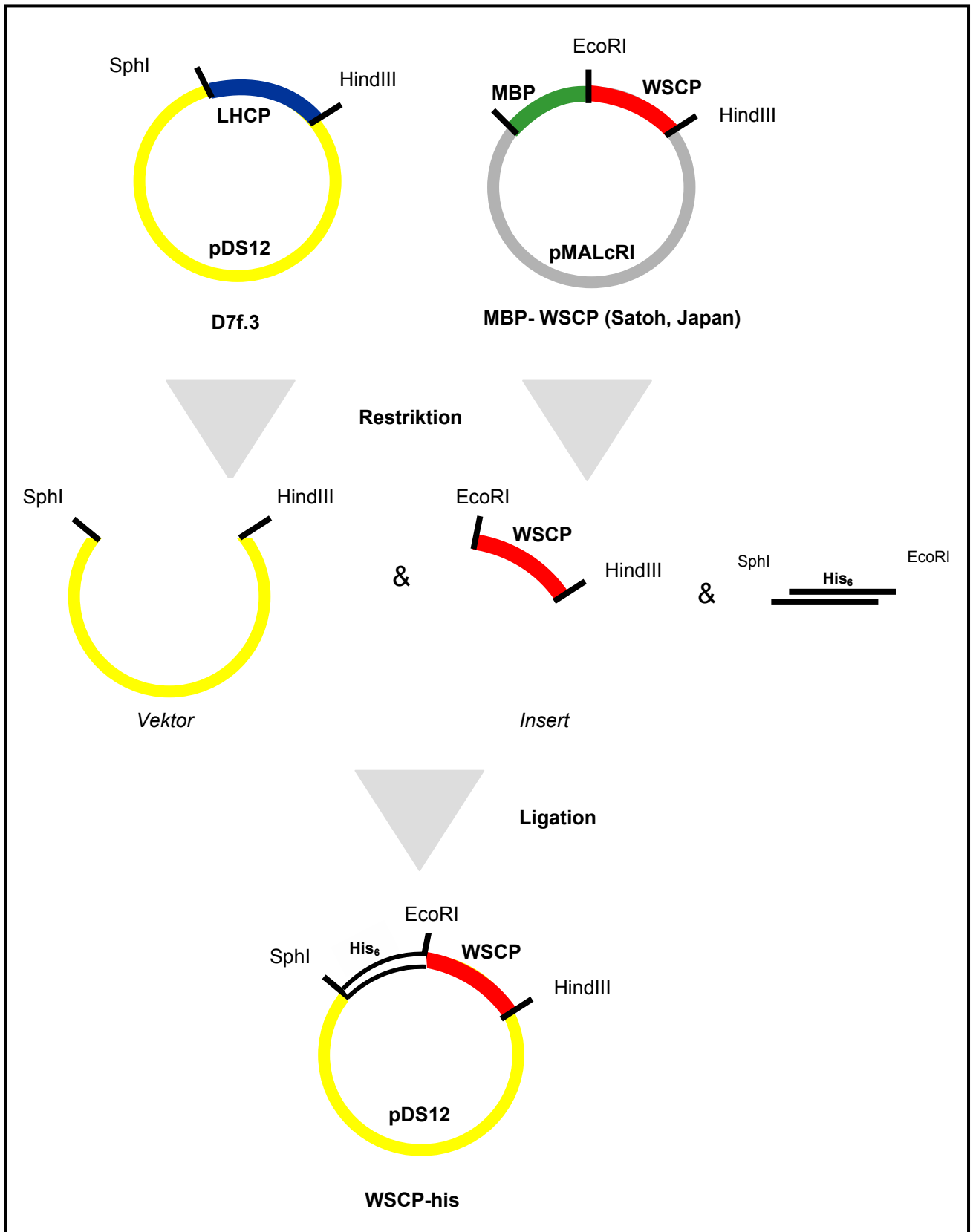


Abb. 2.3: WSCP-his-Klonierungsstrategie, schematische Übersicht.

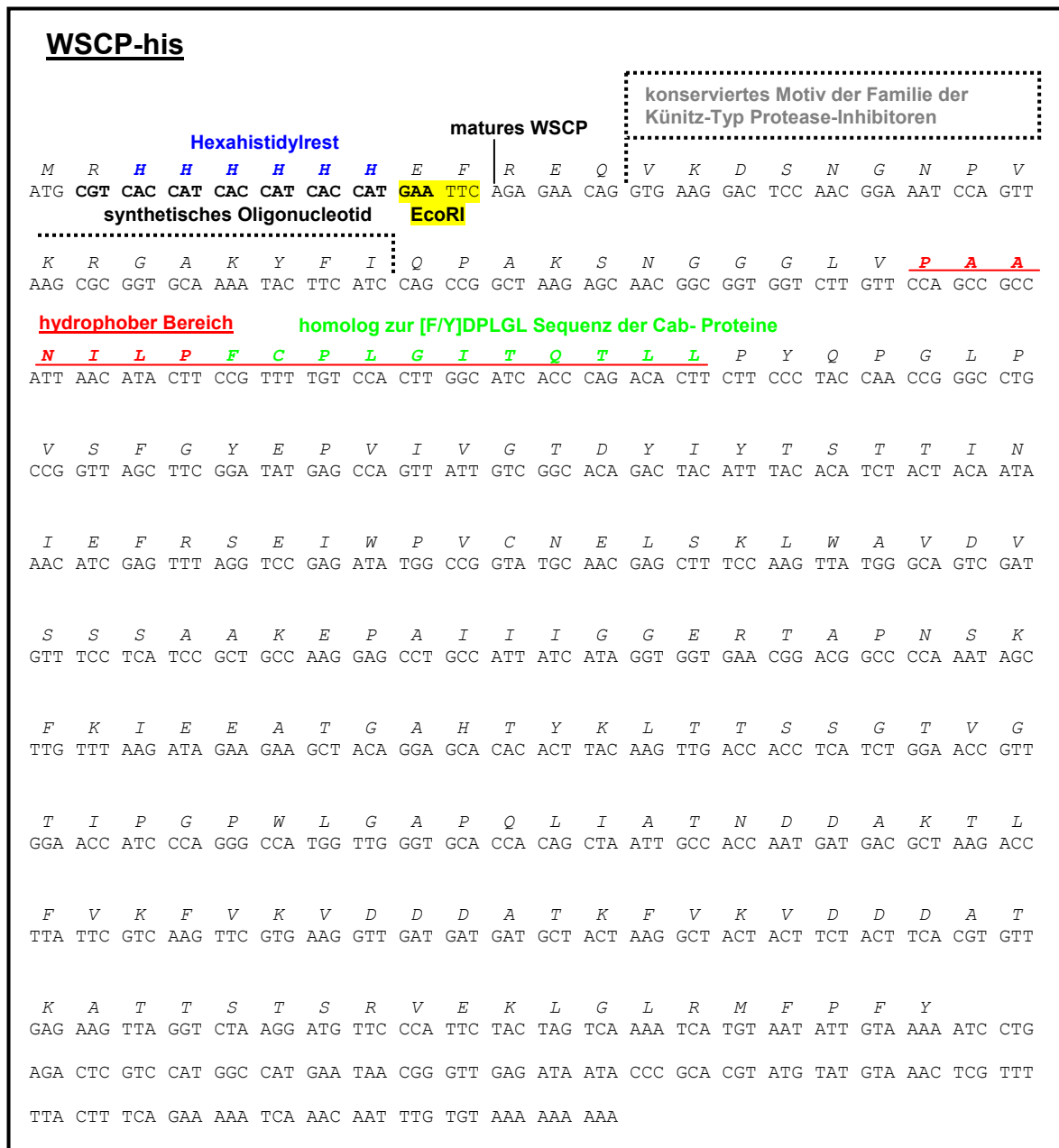


Abb. 2.4.: Nucleotid- und Aminosäuresequenz des Klons WSCP-his. *Kursiv* dargestellt ist die Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode, darunter die Nucleotidsequenz. (vgl. hierzu auch Abb 3.1)

2.2.4. Oligonucleotide

Zum Einfügen des His-Tags wurden folgende Oligonucleotide verwendet:

		<u>Met Arg(His His His His His His)</u>
"WSCP-his +"	(sense)	CGT CAC CAT CAC CAT CAC CAT G
"WSCP-his -"	(antisense)	G TAC GCA GTG GTA GTG GTA GTG GTA CTT AA

Um eine Störung der Expression eines His-Tags direkt hinter einem Methionin zu vermeiden, wurde vor dem Hexahistidylrest zusätzlich ein Arginin (CGT, codon usage in *E. coli* 64,25%) eingefügt. Das Startcodon ergab sich durch die SphI-Schnittstelle, die ein ATG beinhaltet. Oligonucleotide werden i.d.R. einzelsträngig geliefert. Vor der Verwendung müssen sie also hybridisiert (annealed) und phosphoryliert werden.

2.2.5. Annealing der Oligonucleotide

Zum Annealing werden die Oligonucleotide in sterilem H₂O *dest.* aufgenommen und in 1 x Annealing-Puffer auf 50 pmol/μl eingestellt. Je 20 μl des sense/antisense Oligonucleotides werden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und für 10 Minuten bei 100°C inkubiert. Das Annealing der DNA-Stränge erfolgt während des Abkühlens, dazu wird der Reaktionsansatz in gerade nicht mehr kochendes Wasser gestellt um ein möglichst langsames Abkühlen (ü.N.) zu erreichen.

10 x Annealing-Puffer: 380 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM MgCl₂, 500 mM NaCl

2.2.6. Phosphorylierung der Oligonucleotide

Die hier verwendeten Oligonucleotide wurden synthetisch hergestellt, die 5'-Enden sind in der Regel nicht phosphoryliert. Für eine Ligation mit dephosphoryliertem Vektor jedoch muss zuvor eine Phosphorylierung mit Polynucleotidkinase (PNK) und ATP durchgeführt werden. Dazu wird der Annealing-Ansatz (1 nmol DNA, 40 μl) mit 5 Units (U) T₄ PNK und 1 mM ATP in 1 x PNK-Puffer vermischt und 1h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die PNK wird danach für 20 Minuten bei 65°C inaktiviert.

10 x PNK-Puffer: 500 mM Tris-HCl pH 7,6, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 1 mM Spermidin

2.2.7. Restriktion von DNA

Zum Schneiden der DNA mit Restriktionsendonucleasen wurde jeweils 1 U Enzym je 2 µg DNA eingesetzt. 1 U entspricht der Menge des benötigten Enzyms für den Verdau von 1 µg DNA bei optimaler Temperatur innerhalb einer Stunde.

Enzym	Erkennungssequenz	Puffer	Restriktionsdauer	Temperatur optimum	Inaktivierung
EcoRI	G↓AATTC	EcoRI	2 h	37°C	65°C, 20 min
HindIII	A↓AGCTT	NEBuffer 2	2 h	37°C	65°C, 20 min
SphI	GCATG↓C	NEBuffer 2	2 h	37°C	65°C, 20 min

Tab. 2.1: Übersicht über die verwendeten Restriktionsendonucleasen: Erkennungssequenz und Eigenschaften.

Restriktion des Vektors:

Als Ausgangsplasmid wurde D7f.3 (in pDS12/RGBII) verwendet.

Der Verdau wurde mit HindIII und SphI in NEBuffer 2 für 2 h bei 37°C durchgeführt. Der Restriktionsansatz für den Vektor setzt sich wie folgt zusammen:

DNA	3 µg	2,42 µl
NEBuffer 2	1/10	3 µl
BSA	0,1 µg/µl	3 µl
SphI	1,5 U	0,3 µl (5 U/µl)
HindIII	1,5 U	0,15 µl (10 U/µl)
dd H ₂ O	ad 30 µl	21,13 µl

Restriktion des Inserts:

Das WSCP-Insert wurde aus dem Plasmid MBP-WSCP in pMALcRI gewonnen.

Der Verdau wurde mit HindIII und EcoRI im Puffer EcoRI für 2h bei 37°C durchgeführt. Der Restriktionsansatz für das Insert setzt sich wie folgt zusammen:

DNA	8 µg	50 µl
Puffer EcoRI	1/10	6 µl
EcoRI	4 U	1,6 µl (2,5 U/µl)
HindIII	4 U	0,4 µl (10 U/µl)
dd H ₂ O	ad 60 µl	2 µl

NEBuffer 2: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,9, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT
 Puffer EcoRI: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM β-ME, 100 µg BSA/ml

2.2.8. Agarose-Gelelektrophorese

In Agarosegelen können Nucleinsäuren der Größe nach aufgetrennt werden. Je nach Agarosekonzentration kann der gewünschte Trennbereich variiert werden. Für die nachfolgend beschriebenen Arbeiten wurden 1,5%-ige Gele [w/v] benutzt, die einen Trennbereich von 0,2–3 kb haben. Analytische Agarosegele werden zur Auftrennung von Restriktionsansätzen verwendet, um beispielsweise die Vollständigkeit des Verdau zu testen. Zur Aufreinigung von z. B. Vektor und Insert mit anschließender Extraktion der DNA werden präparative Agarosegele benutzt, die sich von den analytischen Gelen durch größere Auftragstaschen unterscheiden.

Für 10 Minigel werden 1,5 g Agarose in 100 ml 1 x TBE aufgenommen und in der Mikrowelle bei 360 W einige Minuten erwärmt bis die Agarose vollständig gelöst ist. Nach kurzem Abkühlen werden je Minigel 10 ml Agaroselösung mit einer Glaspipette auf die mit Kämmen bestückten und in die Gießkammer eingelegten, entfetteten Glaträgerplatten gegossen. (Für präparative Agarosegele werden je 3 Kämmen mit Tesafilm vereint.)

Pro analytisches Gel werden ca. 30 ng DNA in 1 x Auftragspuffer aufgetragen. Die Proben werden nun in einer horizontalen Kammer bei 140 V in das Agarosegel einlaufen gelassen und daraufhin bei 200 V getrennt, bis das Bromphenolblau am unteren Gelrand angekommen ist. Der Gelpuffer 1 x TBE wurde mit 5 µl/100 ml Ethidiumbromid-Stammlösung versetzt. Zur Analyse des Gels werden die Banden durch Belichtung mit UV unter der Versa Doc (Ethidiumbromid-Filter, Belichtung ca. 30 sec.) sichtbar gemacht.

Soll die DNA nach der Auftrennung aus dem Gel extrahiert werden, wird dieses kurz unter die UV-Handlampe gehalten, so dass die interessanten Banden mit einem Skalpell markiert werden können. Hierbei ist es wichtig, dass die Belichtung bei 312 nm und nicht zu lange erfolgt, um eine Beschädigung der DNA zu verhindern. Die Banden können nun ausgeschnitten und ihr Gewicht bestimmt werden.

10 x TBE: 0,89 M Tris, 0,89 M Borsäure, 0,5 M EDTA

10 x Auftragspuffer: 10 mM NaOH, 1 mM EDTA, 80% [v/v] Formamid (deionisiert), 0,1% [w/v] Xylen Cyanol, 0,1% [w/v] Bromphenolblau

Ethidiumbromid-Stammlösung: 10 mg/ml in H₂O *bidest.* (cancerogen!)

2.2.9. Aufreinigung von DNA aus Gelschnipseln über eine Nucleo Trap-Säule

Die Extraktion von DNA aus Gelschnipseln erfolgte mit dem Kit „Nucleo Trap“ (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) gemäß der Anleitung der Hersteller. Die DNA wurde anschließend in 5 mM Tris pH 8,5 aufgenommen und kann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

2.2.10. DNA-Quantifizierung

Die Quantifizierung von DNA erfolgt photometrisch nach folgender Formel:

$A_{260} = 1$	entspricht	50 $\mu\text{g DNA / ml}$
---------------	------------	---------------------------

2.2.11. Dephosphorylierung des Vektors

Zur Vermeidung von Religanden bei der Ligation sollte der Vektor zuvor dephosphoryliert werden. Das geschieht mit dem Enzym CI-AP (calf intestine Alkaline Phosphatase), was Phosphatgruppen an DNA-5'-Enden entfernt. Dazu wird die DNA-Lösung (~600 ng DNA) auf 1 x OPA eingestellt und mit 0,1 U CI-AP versetzt. Der Ansatz wird nun 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das Enzym wird anschließend für 15 Minuten bei 85°C hitzeinaktiviert.

10 x OPA: (One-Phor-All Buffer Plus) 10 mM Tris-Acetat pH 7,5, 10 mM Mg-Acetat, 50 mM K-Acetat

2.2.12. Ligation von Vektor, Insert und Oligonucleotiden

In die Ligation wurden Vektor und Insert im Verhältnis V:I = 1:2 eingesetzt. Der Ansatz von 10-20 μl enthält 1 x T₄ DNA Ligase-Puffer mit 10 mM ATP und wird mit 1/20 Volumen T₄ DNA Ligase versetzt. Die Ligation erfolgt während der Inkubation für 4 h bei 16°C oder ü.N. bei 4°C.

10 x T₄ DNA Ligase-Puffer: 0,5 M Tris-HCl pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM Spermidin, 1 mg/ml BSA

2.2.13. Transformation

Transformationskompetente *E. coli*-Zellen zeichnen sich durch eine erhöhte Membranpermeabilität aus und können so relativ leicht Fremd-DNA aufnehmen. Die Kompetenz wird erreicht, indem man Bakterienzellen in hohen Kalziumkonzentrationen auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA wird dann durch einen kurzen Hitzeschock erleichtert.

50 μl kompetente Zellen (Stamm: JM101, Genotyp *supE, thi-1, Δ(lac-proAB)[F⁺traD36, proAB, lacI^q, Z ΔM15]*) werden auf Eis aufgetaut. Nun wird ½ Ligationsansatz hinzugegeben, mit den Zellen durch vorsichtiges Schnippen gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Als Kontrolle wurde an dieser Stelle immer auch eine Transformation mit entsprechender Vektormenge allein bzw. mit Wasser mitgeführt. Der Hitzeschock erfolgt anschließend für 5 Minuten bei 22°C (im Wasserbad). Danach werden 225 μl vorgewärmtes LB-Medium (ohne Ampicillin) hinzugegeben und der Ansatz eine

Stunde bei 37°C auf dem Drehrad im Brutschrank inkubiert. Ca. 150 µl davon werden dann auf vorgewärmten LB-Amp-Platten ausplattiert und ü.N. bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Bakterien, die das transformierte Plasmid tragen, können aufgrund der eingeführten Antibiotikaresistenz auf LB-Amp-Medium wachsen und bilden Kolonien aus.

LB-Medium: (Luria Bertani-Medium), 1% Pepton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl (pH 7,5)
1/1000 Vol. Amp (100 mg/ml) wird frisch hinzugegeben.

2.2.14. Test auf erfolgreiche Ligation mittels einer Induktion im Mini-Maßstab

Mit dieser Methode soll schnell und ohne großen Materialaufwand getestet werden, ob das von einem neuen Klon codierte Protein von Bakterienzellen erfolgreich überexprimiert wird. Hierzu werden einige Kolonien der Transformation mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in je 500 µl LB-Amp-Medium überimpft. Als Negativkontrolle dienen 10 µl einer Wasser-Transformation. Nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C im Drehrad im Brutschrank wird mit 1 mM IPTG induziert und alles nochmals 3 Stunden bei 37°C im Drehrad belassen. Anschließend werden die Bakterien abzentrifugiert (1 min, 10 000 x g, RT), das Pellet mit 1/3 Volumen Sparmix versetzt und 2 Minuten gekocht. Die Zellen werden so lysiert und über eine denaturierende SDS-PAGE kann der Erfolg der Überexpression kontrolliert werden.

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

2.2.15. Plasmidisolierung mittels Mini- und Midi-Präparation

Die Plasmidisolierung aus transformierten Bakterienzellen im kleinen bzw. großen Maßstab wurde mit dem Nucleobond AX-20 bzw. dem Nucleobond AX-100 System (Macherey-Nagel) gemäß der Anleitung der Hersteller durchgeführt.

2.2.16. Sequenzier-PCR

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgt nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977). Für die Sequenzierreaktion wird je ein Primer eingesetzt, der mit der einzelsträngigen denaturierten DNA, dem Template, hybridisiert. Es wird so ein doppelsträngiger Startpunkt für die Polymerase geschaffen, die den Strang des Templates mit dNTP's und ddNTP's auffüllt (Desoxy- und Didesoxyribonucleosidtriphosphate). Die ddNTP's zeichnen sich durch das Fehlen einer Hydroxylgruppe am 3'-Zucker aus, was beim Einbau zum Stopp der Elongation führt. Außerdem sind an die ddNTP's für jeden Basentyp unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gebunden. Bei der

Sequenzierreaktion entstehen nun unterschiedlich lange Kettenabbruchfragmente, die am Ende mit dem für die jeweilige Base kennzeichnenden Farbstoff markiert sind. Statistisch sind diese Fragmente so verteilt, dass sie das gesamte Template abdecken. Bei längeren Templates werden in zwei Ansätzen ein sense- und ein antisense-Primer verwendet, so dass von beiden Seiten in das Template hineingelesen werden kann.

Für die Sequenzier-PCR wurde der PCR Premix „Big Dye“ (GENTERprise) verwendet. In einem Ansatz von ca. 20 µl wurden 250-300 ng DNA mit je 10 pmol des sense- und des antisense-Primers versetzt. Für den Klon WSCP-his wurde der sense-Primer DS23+ und der antisense-Primer DS178- verwendet. Der Ansatz wurde mit ¼ Volumen Premix „Big Dye“ versetzt und mit sterilem ddH₂O auf das Endvolumen aufgefüllt. Die Sequenzierreaktion fand in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel statt, es wurde das Programm „Sequence“ verwendet (vgl. Tab. 2.2). Nach der PCR können die Produkte bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert werden. Die PCR-Produkte wurden nach der Reaktion gefällt und getrocknet. Die Fällung wurde in 0,4 M Na-Acetat und 70% Ethanol (p.A.) für 10 Minuten auf Eis durchgeführt, anschließend wurde für 30 Minuten bei 26 000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 70% Ethanol (p.A.) gewaschen und abermals für 10 Minuten zentrifugiert. Das Trocknen der DNA erfolgte in der Speed-Vac mit eingeschalteter Heizung.

Das Sequenziergel und die Bestimmung der Basensequenz aus dem Gel wurden von der Firma GENTERprise[®], Universität Mainz, durchgeführt.

Programm	Zyklen	Initial-denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	abschließende Aufbewahrung
„Sequence“	35	1 min, 95°C	15 sec, 96°C	15 sec, 50°C	4 min, 60°C	4°C, unbegrenzt

Tab. 2.2: Übersicht über das in der PCR verwendete Sequenzierprogramm

2.2.17. Anlegen von Dauerkulturen

Zur langfristigen Aufbewahrung von transformierten Bakterienzellen können Dauerkulturen angelegt werden. Die Bakterienzellen überleben in mit Glycerin versetztem Medium eine Lagerung bei -80°C, sind aber währenddessen nicht teilungsfähig.

Von einer mit transformierten *E. coli* Zellen ausplattierten LB-Amp-Platte wird mit einer sterilen Pipettenspitze eine Kolonie gepickt und in 5 ml flüssiges LB-Amp-Medium überimpft. Diese Vorkultur wird ü.N. bei 37°C im Drehrad inkubiert. Am Folgetag werden je 200 µl der ü.N.-Kultur 800 µl 80%-iges Glycerin hinzugegeben und mit den Zellen durch vorsichtiges Schnippen vermischt. Aliquots à 50 µl werden bei -80°C gelagert.

2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.3.1. Überexpression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Die in dieser Arbeit verwendeten Proteine können in Bakterien überexprimiert sowie anschließend daraus isoliert und aufgereinigt werden. Dazu werden *E. coli*-Zellen mit einem Klon transformiert, der für das gewünschte Protein codiert (vgl. 2.3.13). Die Proteine werden dann in der Bakterienzelle überexprimiert und dort als lösliche Proteine oder als sog. Einschlusskörperchen (Inclusion bodies, IB) akkumuliert. Bei IB's handelt es sich um inerte Proteinklumpen, aus denen das gewünschte Protein durch eine geeignete Kombination an Detergentien in unterschiedlichen Waschschrritten aufgereinigt werden kann. Die Isolation und Aufreinigung ist je nach Protein verschieden.

Das LHCP sowie das OHP werden von der *E. coli*-Zelle in Form von IB's gelagert und auch als solche isoliert. MBP-WSCP ist ein lösliches Protein und wird in dieser Form in der Zelle akkumuliert. Eine Aufreinigung erreicht man über den MBP-Teil des Fusionsproteins, der an eine Amylose-Resin Säule bindet. WSCP-his ist ebenfalls löslich, die Überexpression ist jedoch sehr effizient, so dass das Protein in der Zelle sowohl als lösliches Protein als auch als unlösliche IB's akkumuliert wird. Das lösliche WSCP-his kann über den Hexahistidylrest an eine Nickel-NTA-Säule gebunden und so aufgereinigt werden.

Die 2-Helix-Proteine Sep 1 und Sep 2 wurden uns im Rahmen einer Kooperation mit Iwona Adamska, Stockholm, zur Verfügung gestellt. Sep 1 stellt ein Fusionsprotein mit dem N-terminal angehängten Thioredoxin dar, Sep 2 ist kein Fusionsprotein. Beide Proteine wurden nach Überexpression über eine Nickel-NTA-Säule aufgereinigt. Das PsbS-Protein wurde uns im Rahmen einer Kooperation mit Claudia Büchel, Frankfurt, zur Verfügung gestellt. Das Protein enthält einen Hexahistidylrest und wird ebenfalls über eine Nickel-NTA-Säule gereinigt. Im Folgenden wird die Überexpression und Aufreinigung von LHCP, OHP, MBP-WSCP und WSCP-his beschrieben.

Übersicht über die Methode

Da sich Induktion, Überexpression und Isolation der in dieser Arbeit verwendeten Proteine sich zwar in Einzelheiten unterscheiden, jedoch prinzipiell einem Grundprotokoll folgen, sollen hier zunächst die generellen Schritte beschrieben werden. Die Einzelheiten sind in Tabelle 2.3 zusammengestellt.

Am Vortag der IB-Präparation wird eine Vorkultur angesetzt. Dazu wird von einer LB-Amp-Platte mit dem gewünschten Klon eine Kolonie gepickt und daraus eine flüssige, mit Ampicillin versetzte Vorkultur angeimpft. Diese wird ü.N. bei 37°C im Drehrad inkubiert. Am darauf folgenden Tag wird die Vorkultur zur Hauptkultur gegeben und bis zur Induktion bei 37°C und 220 rpm auf dem Bakterienschüttler inkubiert. Die Kultur sollte zum Zeitpunkt der Induktion eine OD₅₅₀ von 0,5 haben. Nun wird mit 1 mM IPTG induziert und abermals bei 37°C und 220 rpm auf dem Schüttler inkubiert.

Zur Ernte der Zellen wird nun die Hauptkultur abzentrifugiert. Das Pellet wird in 30 ml Lysispuffer resuspendiert und die Zellen mit der French Press in 2 Durchläufen mechanisch aufgebrochen. Das Lysat wird auf Eis gehalten.

Nach dem Zellaufschluss wird für die Aufreinigung von löslichen Proteinen der Überstand, von IB's das Pellet verwendet. Die im Überstand befindlichen Proteine werden entweder über einen angehängten His-Tag auf einer Nickel-Säule aufgereinigt oder es wird, wie im Fall von MBP-WSCP, eine Affinitäts-Säule zur Aufreinigung herangezogen (vgl. Tab. 2.3). Nach Zentrifugation des Lysates wird das Pellet in Lysispuffer aufgenommen. Um störende DNA zu entfernen, wird im nächsten Schritt DNase zugesetzt. Anschließend werden eventuell Waschschriffe mit geeigneten Detergentien durchgeführt, bevor die aufgereinigten IB's in Puffer aufgenommen, quantifiziert und aliquotiert bei -20°C gelagert werden.

<u>Bakterien:</u>	<i>E. coli</i> Stamm JM 101 (vgl. 2.2.11)
<u>Detergenspuffer:</u>	200 mM NaCl, 1% [w/v] Desoxycholsäure, 1% [v/v] NP-40, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM EDTA, 10 mM 2-ME
<u>DNase-Puffer:</u>	20 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA 50% [v/v] Glycerin; darin 1 mg/ml DNase.
<u>Elutionspuffer:</u>	50 mM NaP pH 8,0, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol
<u>Hochsalzpuffer:</u>	(HS-Puffer): 0,5 M NaCl in Säulenpuffer
<u>LB-(Luria Bertani) Medium:</u>	1% Pepton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl (pH 7,5) frisch 1/1000 Vol. Amp (100 mg/ml) zugeben
<u>Lysispuffer:</u>	50 mM Tris-HCl pH 8,0, 25% [w/v] Sucrose, 1 mM EDTA
<u>Lysis-Puffer W:</u>	50 mM Natriumphosphat (NaP) pH 8,0, 300 mM NaCl, 15 mM Imidazol
<u>NZCYM-Medium:</u>	22,459 g/l NZCYM Broth (Sigma) + 100 µg/ml Amp
<u>Puffer L:</u>	10 mM Na_2HPO_4 , 30 mM NaCl, 0,25% [v/v] Tween 20, 10 mM 2-ME, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, frisch: 20 µg/ml PMSF. Auf pH 7,0 einstellen und mit entgastem <i>A. dest</i> auffüllen.
<u>Säulenpuffer:</u>	10 mM NaH_2PO_4 , 10 mM 2-ME, 1 mM EGTA, frisch: 20 µg/ml PMSF. Auf pH 7,0 einstellen und mit entgastem <i>A. dest</i> auffüllen.
<u>Triton-Puffer:</u>	0,5% [v/v] Triton X-100, 1 mM EDTA, 10 mM 2-ME
<u>Tris-Puffer:</u>	50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 10 mM 2-ME
<u>Wasch-Puffer:</u>	50 mM NaP pH 8,0, 300 mM NaCl, 25 mM Imidazol

	LHCP	OHP	MBP-WSCP	WSCP-his
Vorkultur	5 ml LB-Amp-Medium, ü.N. bei 37°C	10 ml NZCYM-Amp-Medium + 10 mM Glucose, ü.N. bei 37°C	5 ml LB-Amp Medium + 10 mM Glucose, ü.N. bei 37°C	10 ml LB-Amp Medium, ü.N. bei 37°C
Hauptkultur	100 ml LB-Amp, 37°C	1 l NZCYM-Amp, 37°C	100 ml LB-Amp + 10 mM Glucose, 37°C	500 ml LB-Amp, 37°C
Induktion	nach ca. 1 h mit 1 mM IPTG	nach ca. 2 h mit 1 mM IPTG	nach ca. 3,5 h mit 1 mM IPTG	nach ca. 2 h mit 1 mM IPTG
Ernte der Zellen	4 h nach Induktion durch Pelletieren (3 min, 4°C, 7880 x g = 8000 rpm, Beckman Kühlzentrifuge Rotor JLA 10500)	2-3 h nach Induktion durch Pelletieren (3 min, 4°C, 7880 x g = 8000 rpm, Beckman Kühlzentrifuge Rotor JLA 10500)	2 h nach Induktion durch Pelletieren (5 min, 4°C, 7500 x g = 7500 rpm, Beckman Kühlzentrifuge Rotor JLA 10500)	3 h nach Induktion durch Pelletieren (3 min, 4°C, 7880 x g = 8000 rpm, Beckman Kühlzentrifuge Rotor JLA 10500)
Zellaufschluss	in 30 ml Lysispuffer, 2 Durchläufe in der French Press. Pelletieren des Lysates (10 min, 4°C, 5020 x g = 8000 rpm, Beckman Kühlzentrifuge Rotor JA 20).	in 60 ml Lysispuffer, 2 x French Press. Pelletieren des Lysates (20 min, 4°C, 11300 x g = 12000 rpm, Beckman Kühlzentrifuge Rotor JA 20).	in 20 ml Puffer L, 2 x French Press. Lysat in Hochsalzbedingungen durch Einwaage von 0,5 M NaCl, pelletieren (10 min, 4°C, 8840 x g = 10000 rpm, Kühlzentrifuge Rotor JA 20).	in 30 ml Lysispuffer W, 2 x French Press. Pelletieren des Lysates (25 min, 4°C, 10000 x g = 11500 rpm, Beckman Kühlzentrifuge Rotor JA 20).
Isolation und Aufreinigung des Proteins	Pellet + 1 ml Lysispuffer DNase Schritt: 10 µl 1 M MgCl ₂ , 1 µl 1 M MnCl ₂ , 10 µl DNaseI, 15 min RT, 15 min 37°C. + 2 ml Detergenspuffer, mischen, zentrifugieren (5 min, 4°C, 5020 x g = 8000 rpm Rotor JA 20). Pellet + 2 ml Triton-Puffer, ü.N. bei RT schütteln. Pelletieren (s.o.), Pellet + 2 ml Tris-Puffer, pelletieren, aufgereinigte IB's in 500 µl Tris-Puffer.	Pellet + 10 µl Lysispuffer DNase Schritt: 100 µl 1 M MgCl ₂ , 10 µl 1 M MnCl ₂ , 100 µl DNaseI, 15 min RT, 15 min 37°C. + 20 ml Detergenspuffer, mischen, 5 min RT. 20 min, 4°C, 11300 x g = 12000 rpm Rotor JA 20. Pellet + 20 ml Triton-Puffer, ü.N. bei RT schütteln. Pelletieren (15 min, 4°C, 9490 x g = 11000 rpm, Rotor JA 20), Pellet + 15 ml Tris-Puffer, pelletieren, aufgereinigte IB's in 4 ml Tris-Puffer. 1 l Ansatz ergibt ca. 20 mg SR-7.	Überstand 1:1 mit HS-Puffer, 0,25% Tween-20 verdünnen. Auftrag auf zuvor mit 10 ml HS-Puffer äquilibrierte Amylose-Resin Säule (mit 2-Wege-Hahn, Flussrate ca. 0,5 ml/min). Waschen der Säule mit 10 ml HS-Puffer + Tween, 15 ml HS-Puffer. Elution mit 10 ml HS-Puffer + 10 mM Maltose in 500 µl-Fraktionen.	Pellet + 1 ml 50 mM NaP pH 9,0. DNase Schritt: 10 µl DNaseI je 100 ml Hauptkultur, 15 min RT, 15 min 37°C. 25 min, 4°C, 10000 x g = 11500 rpm, Rotor JA 20. + 1-2 ml 50 mM NaP pH 9,0. Überstand auf vorbereitete Ni-NTA-Sepharose geben (vgl. 2.3.10.5). Waschen mit mehreren Vol. Waschpuffer. Elution mit 1-2 ml Eluatpuffer in 500 µl-Fraktionen. 1 l Hauptkultur ergibt ca. 46 mg WSCP _{dhie}

Tab. 2.3: Übersicht über die Überexpressionsmethoden von LHCP, OHP, MBP-WSCP und WSCP-his.

2.3.2 Aufreinigung von nativem WSCP aus Blumenkohlpflanzen

Für die Aufreinigung von nativem WSCP werden 500 g Blumenkohlblätter vom Markt oder Blätter von 2 Monate alten Blumenkohlpflanzen benötigt. Die Pflanzen werden wie unter 2.3.4 beschrieben ausgesät und im ersten Monat mit Hoagland's-Lösung gegossen. Danach werden sie pikiert, so dass je 1 Pflanze einen ca. 10 x 10 cm großen Topf bekommt, und bis zur Ernte mit ½ Hoagland's gewässert. Zur Ernte werden die Pflanzen mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten und im Waring Blendor mit 500 ml kaltem Aufschlusspuffer zerkleinert. Das Homogenat wird durch 2 Lagen Baumwollgaze filtriert.

Nun folgt eine sukzessive Ammoniumsulfatfällung von 40 nach 70% [w/v]. (Eine 4 molare Ammoniumsulfat- (AMS) Lösung entspricht 100%.) Im ersten Schritt werden je ml 212 mg festes Ammoniumsulfat langsam unter Rühren zugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation auf dem Rührer wird der Ansatz 15 Minuten bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge, Rotor JA 20; 26900 x g). Im zweiten Schritt wird die AMS-Konzentration durch Zugabe von 159 mg je ml Ansatz auf 70% erhöht. Wieder wird 10 Minuten auf dem Rührer inkubiert sowie 15 Minuten bei 15000 rpm (26900 x g) und 4°C zentrifugiert. Das Präzipitat wird nun in einem geringen Volumen 100 mM NaP pH 7,4 gelöst und über Nacht bei 4°C gegen denselben Puffer dialysiert.

Das Dialysat wird nun über eine DEAE-Zellulose-Säule weiter aufgereinigt. Dabei handelt es sich um eine Anionenaustauscher-Säule, die alle negativ geladenen Teilchen zurückhält. Positiv geladene Moleküle wie das WSCP können die Säule passieren. Das Dialysat wird auf eine mit 4 ml Säulenmaterial beladene und zuvor mit 100 mM NaP pH 7,4 äquilibrierte Säule gegeben (Fractogel EMD, DEAE-650, M = 40-90 µm). Der erhaltene Durchfluss wird in Centrikon Röhrchen (30 kD Cutoff) bis auf ein Volumen von ca. 300 µl aufkonzentriert und gleichzeitig durch mehrmaliges Waschen mit 10 mM NaP pH 7,4 in diesen Puffer transferiert. Die DEAE-Zellulose-Säule kann wieder regeneriert werden, indem zunächst mit vierfachem Säulenvolumen H₂O *dest.* gewaschen wird. Dabei wird das Säulenmaterial mehrmals aufgewirbelt. Anschließend erfolgt ein Waschschrift mit zwei Volumen 2 M NaCl und dann mit 0,5 M NaOH. Die Säule wird mit H₂O *dest.* neutral gewaschen und abschließend mit 20% Ethanol überschichtet und verschlossen bei 4°C gelagert.

Nun schließt sich zur weiteren Aufreinigung eine detergentsfreie 8%-ige PAGE an (vgl. 2.3.12). Vor dem Start werden alle Taschen im Sammelgel zu einer großen Tasche vereint. Nach Beendigung des Laufes kann man eine dominante grüne Hauptbande von mehreren kleinen Banden unterscheiden. Die Hauptbande wird nun ausgeschnitten und mit der „crush and soak“ Methode extrahiert. Dazu wird die Bande mit ca. 600 µl 10 mM NaP pH 7,4 in ein Eppendorfgefäß gegeben und mit einem blauen Plastikstößel zerrieben. Dann wird die Probe über Nacht auf Eis inkubiert um eine möglichst vollständige Diffusion des nativen Proteins aus dem Gel in den Puffer zu gewährleisten. Zur Entfernung des Gelrestes wird schließlich 10 Minuten bei 4°C und 15000 x g zentrifugiert.

Abschließend erfolgt eine Gelfiltration durch eine mit 4 ml Sephacryl 200 (Pharmacia; Trennbereich 5–250 kD) gepackte Säule. Das Sephacrylgel besteht aus kleinen Kügelchen, die über winzige Poren in ihrer Außenwand kleinste Moleküle aufnehmen können. Das WSCP kann aufgrund seiner Größe nicht zurückgehalten werden und passiert die Säule. Die Elution erfolgt mit 10 mM NaP pH 7,8. Das native WSCP wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Sephacryl-Säule wird regeneriert, indem sie zunächst mit dreifachem Säulenvolumen NaP pH 7,8 gewaschen wird. Es folgt ein Waschschriff mit drei Volumen 1% SDS, das Säulenmaterial wird dabei mehrmals aufgewirbelt. Dann wird die Säule mit vier Volumen 10 mM NaP gewaschen und mit 20% Ethanol überschichtet bei 4°C gelagert.

<u>Aufschlußpuffer:</u>	100 mM NaP pH 7,4; 850 mM NaCl		
<u>Hoagland's Lösung:</u>	<i>Makroelemente</i>	KNO_3 (1 M)	6 ml ad 1 l
(mod. von Dr. Günther		$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ (1 M)	4 ml
Ochs für die Anzucht		$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (1 M)	2 ml
von Raps)		$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (1 M)	1 ml
	<i>Mikroelemente</i>	KCl (25 mM)	2 ml
		H_3BO_3 (12,5 mM)	2 ml
		$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (1 mM)	2 ml
		$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (1 mM)	2 ml
		$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (0,25 mM)	2 ml
		H_2MoO_4 (85% MoO_3 ; 0,25 mM)	2 ml
		NaFeDTPA (10% Fe; 53,7 mM, Ciba Geigy)	0,3-1 ml
	<i>außerdem (fakultativ)</i>	$\text{NiSO}_4 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (0,25 mM)	2 ml
		$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$ (1 M)	1 ml

2.3.3. Proteinquantifizierung

Es gibt verschiedene Methoden, die Konzentration einer Proteinlösung zu bestimmen. Die passende Methode wird je nach Beschaffenheit und Eigenschaften des zu bestimmenden Proteins ausgewählt.

2.3.3.1. Photometrische Quantifizierung mittels UV-Absorptionsmessung

Die aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin absorbieren Licht im UV-Bereich. Anhand der Aminosäuresequenz kann nach dem „Schepartz Biopolymer Calculator“ (<http://paris.chem.yale.edu/extinct.html>) der für das zu quantifizierende Protein spezifische Extinktionskoeffizient bestimmt werden. Das Programm gibt dann in einer Formel an, welche Konzentration eine Lösung des Proteins hat, wenn die Absorption bei 280 nm 1 beträgt. Für das LHCP wurde eine Eichgerade erstellt (Hobe, 1995) und daraus der molare Extinktionskoeffizient von $4,85 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ermittelt.

Für die Quantifizierung des LHCP ergibt sich folgende Formel:

LHCP

$A_{280} = 0,1$	entspricht	52,2 $\mu\text{g/ml}$
-----------------	------------	---

Für die Quantifizierung des OHP wurde mit dem Biopolymer Calculator folgende Formel bestimmt (Diplomarbeit S. Raunser, 2000):

OHP

$A_{280} = 0,1$	entspricht	172 $\mu\text{g/ml}$
-----------------	------------	--

Die Konzentration des WSCP kann ebenfalls mit Hilfe des Biopolymer Calculator mit nachstehenden Formeln errechnet werden:

natives WSCP

$A_{280} = 1$	entspricht	0,034 mM	oder	0,81 mg/ml
---------------	------------	-----------------	------	-------------------

WSCP-his

$A_{280} = 1$	entspricht	0,035 mM	oder	0,79 mg/ml
---------------	------------	-----------------	------	-------------------

Zur photometrischen Quantifizierung von Membranproteinen wird ein Aliquot IB's in A_{280} -Puffer gelöst und so verdünnt, dass die Absorption bei 280 nm kleiner als 1 ist. Anschließend wird die Probe 2 Minuten bei 100°C gekocht um die vollständige Denaturierung des Proteins zu gewährleisten. Gemessen wird gegen A_{280} -Puffer als Kontrolle.

Da es sich beim WSCP um ein lösliches Protein handelt, kann hier auf den Zusatz von A_{280} -Puffer verzichtet werden. Gemessen wird direkt bei 280 nm gegen den entsprechenden Puffer als Kontrolle. Für manche Proteinquantifizierungen ist eine vorherige Fällung des Proteins notwendig, die beispielsweise zum Ziel haben kann, störendes Pigment zu entfernen. Für die Fällung wurde in dieser Arbeit zunächst die Lösung mit 0,1 Volumen 100 mM Essigsäure angesäuert um die Pigmente zu zerstören und so die Bindung an das Protein zu lockern. Anschließend wurde durch Zugabe von 2,3 Volumen 100%-igem Aceton das Protein bei -20°C für mindestens 1 Stunde ausgefällt. Das Pigment begibt sich bei der Fällung in den acetonischen Überstand, der durch Zentrifugation (15-20 min, 4°C, 25200 x g = 14000 rpm, Eppendorf Tischzentrifuge) vom Protein getrennt wird. Das Pellet wird gegebenenfalls durch Waschen mit 70% Ethanol von Pigmentresten befreit.

A_{280} -Puffer:

10 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 1 mM 2-Mercaptoethanol

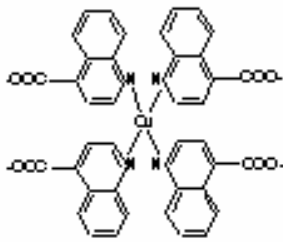
2.3.3.2. BCA-Assay

Abb. 2.5:
Kupfer(I)- BCA- Komplex

Dieser Assay macht es sich zunutze, dass die Aminosäuren Cystein, Tryptophan und Tyrosin Cu(II) zu Cu(I) reduzieren. Bicinchoninic Acid (BCA) bildet mit den entstandenen Cu(I)-Ionen einen violett gefärbten Komplex, der photometrisch nachgewiesen werden kann. Die Proteinkonzentration wird anhand einer mitgeführten Eichreihe mit BSA bestimmt. Es werden als Eichpunkte 0, 1, 2, 5, 10 und 20 µg BSA in je 50 µl 1% [w/v] SDS in Eppendorfgefäße gegeben. Gleichermaßen wird die zu messende Probe in 50 µl 1% SDS aufgenommen. Zu Probe bzw. Eichpunkt werden je 1 ml SRA und 20 µl SRB gegeben. Die Proben werden 30 Minuten bei 60°C inkubiert und nach Abkühlen die Absorption bei 562 nm gemessen.

Analog zu dem 1 ml-Ansatz kann der BCA-Assay auch im Microtiterplatten-Lesegerät vermessen werden. Dazu setzt man 1/5 des Volumens für Eichreihe und Proben erst in Eppendorfgefäßen an und gibt es nach der Inkubation zum Messen in ein 96-well-plate.

SRA-Lösung: 1% [w/v] BCA-Natriumsalz, 2% [w/v] Na₂CO₃ x H₂O, 0,16% [w/v] Na₂-Tartrat, 0,4% [w/v] NaOH, 0,95% [w/v] NaHCO₃; der pH-Wert wird mit 5 N NaOH auf 11,25 eingestellt.

SRB-Lösung: 4% [w/v] CuSO₄ x 5 H₂O

2.3.3.3. CBQCA-Assay

Für Proteine, die aufgrund eines geringen Anteils an aromatischen Aminosäuren weder photometrisch noch mit dem BCA-Assay quantifiziert werden können, wie in dieser Arbeit das PsbS-Protein, kann der CBQCA Protein Quantitation Kit (C-6667, Molecular Probes) verwendet werden. Dieser Kit ist eine sehr sensitive Methode zur Bestimmung der Proteinmenge über die zugänglichen Amine. Das in wässriger Lösung nicht fluoreszierende ATTO-TAG CBQCA Reagenz bildet in Gegenwart von Cyaniden mit primären Aminen ein stark fluoreszierendes Derivat, dass dann im Fluoreszenz-Spektrometer vermessen werden kann. (Für Details und Vorbereitung der Proben siehe Produktinformation der Firma Molecular Probes.)

2.3.4. Isolation und Aufreinigung von Pigmenten aus Erbsenblättern

2.3.4.1. Herstellung von Totalextrakt

Für die Extraktion von Pigmenten aus Erbsenpflanzen werden zwei Schalen (40 x 60 cm) Erbsen (*Pisum sativum* var. *Golf*) ü.N. unter Luftzufuhr eingequollen und auf Vermikulit (Härte K4, Klein Dämmstoffe, Zellertal) ausgesät. Die Anzucht erfolgte in Klimakonstanträumen unter Beleuchtung (16:8 h Licht-Dunkel-Rhythmus, ca. $150 \mu\text{mol} \cdot \text{e}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Die 10-14 Tage alten Erbsenpflanzen werden geerntet, indem man sie zunächst mit der Schere in grobe Stücke schneidet. Anschließend werden sie in einem Liter kaltem Aufschlusspuffer im Waring Blendor weiter zerkleinert, bis sie eine durchschnittliche Stückgröße von 2-4 mm² erreicht haben. Das Homogenat wird nun durch 3 Lagen Baumwollgaze in auf Eis stehende 500 ml Zentrifugenbecher filtriert und 10 Minuten bei 4°C und 7880 x g zentrifugiert (8000 rpm; Beckman Kühlzentrifuge; Rotor JLA 10500). Die Pellets werden in insgesamt 400 ml Aceton (p.A. oder destilliert) resuspendiert und erneut wie zuvor zentrifugiert. Die vereinigten Überstände werden in einem großen Becherglas auf Eis gesammelt.

Zur Gewinnung von **Totalextrakt** wird die Acetonphase in einem Scheidetrichter in peroxidfreien Ether überführt, mit *A. dest.* und evtl. unter Zugabe von etwas festem NaCl zur Verbesserung der Phasentrennung gewaschen und einrotiert. Anschließend kann der Totalextrakt in wasserfreiem Aceton wieder aufgenommen, vermessen, aliquotiert, unter Stickstoff getrocknet und bei -20°C gelagert werden.

2.3.4.2. Aufreinigung von Xanthophyllen

Bei der Dioxanfällung werden zu dem auf Eis stehenden Totalextrakt (ca. 400 ml) erst langsam und unter Rühren 60 ml Dioxan gegeben, danach 127 ml H₂O *dest.*, die letzten 30 ml jedoch nur tropfenweise. Nun wird der Rührer ausgeschaltet und die Fällung noch eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend zentrifugiert man das ausgefallene Chlorophyll ab (10 min, 10000 rpm = 12300 x g, 4°C; Beckman Kühlzentrifuge, Rotor JLA10500). Das Chlorophyllpellet wird nun in 50 ml Ether aufgenommen und im Scheidetrichter so oft mit ca. je 100 ml H₂O *dest.* gewaschen, bis die Wasserphase farblos ist. Beim Ausschütteln der Etherphase ist es wichtig, regelmäßig den Scheidetrichter zu entlüften und eine Emulsion zu vermeiden. Die Etherphase wird zur Abtrennung des Restwassers über Nacht bei -20°C eingefroren.

Der **Carotinoide** enthaltende Überstand der Dioxanfällung wird in einen Messzylinder überführt um sein Volumen zu bestimmen. Je 100 ml Probe werden ca. 20 ml Ether, 30 ml H₂O *dest.* und ein wenig festes NaCl dazugegeben und alles im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Nach Vollendung der Phasentrennung wird die Etherphase abgetrennt und kalt und dunkel aufbewahrt. Die wässrige Phase wird nun erneut mit Ether nachextrahiert. Dies wird so lange wiederholt, bis die Wasserphase

nahezu farblos ist. Die Etherphasen werden vereinigt und mit je ca. 75 ml H₂O *dest.* ausgewaschen, bis die Wasserphasen nahezu farblos sind. Das Restwasser wird, wie oben beschrieben, über Nacht bei -20°C ausgefroren. Am nächsten Tag kann sowohl die Chlorophyll- als auch die Carotinoidlösung durch eine vorgekühlte Fritte mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt werden. Beide Etherphasen werden einrotiert.

Der **Carotinoideextrakt** wird einer Verseifung unterzogen, um Fettsäuren und Phytolreste abzuspalten. Dazu wird die einrotierte Etherphase in 50 ml Ethanol (p.A.) aufgenommen und man fügt vorsichtig und unter Schwenken 5 ml 60%-ige KOH-Lösung hinzu. Der Verseifungsansatz wird dann ü.N. bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Am darauf folgenden Tag werden die Carotinoide durch Zugabe von 100 ml Ether und 200 ml H₂O *dest.* in die Etherphase überführt. Die Ethanolphase wird mit 50 ml-Portionen Ether nachextrahiert, bis sie nahezu farblos ist. Die vereinigten Etherphasen werden dann so lange mit H₂O gewaschen, bis dieses farblos ist. Die Etherphase sollte nun rein gelb sein und wird in einem Rundkolben zum Abtrennen des Restwassers bei -20°C ü.N. eingefroren. Am nächsten Tag werden die Eiskristalle aus der Etherlösung über eine vorgekühlte Fritte mit passendem Filter mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Etherlösung einrotiert. Um an dieser Stelle **Gesamtcarotinoide** abzuzweigen wird der Rückstand wieder in wenigen ml wasserfreiem Aceton aufgenommen, vermessen, aliquotiert und unter Stickstoff eingetrocknet bei -20°C gelagert.

Um die **einzelnen Carotinoide** präparativ in reiner Form zu gewinnen werden sie in der präparativen HPLC über eine RP-Säule (Reversed Phase; RPC-Material Prep C18, Waters Nr. 20594) getrennt. Dazu wird erst die Säule mit 82% Aceton (mit 0,1 mM Hepes-KOH pH 7,5 und einer Spatelspitze Na-Dithionit/l) äquilibriert. Anschließend wird die Carotinoidlösung mit Aceton auf max. 50 ml aufgefüllt (max. 50 mg) und mit Wasser auf 82% eingestellt. Um Carotinoidaggregate zu pelletieren wird nun 5 min bei 12300 x g und 4°C zentrifugiert (10000 rpm; Beckman Kühlzentrifuge, Rotor JLA10500). Der Carotinoidüberstand wird nun mit dem Superloop auf die Säule aufgetragen. (Programm „Xanthograd“). Die Elution der Pigmente erfolgt mit 82% Aceton, wenn sich die Banden sehr langsam bewegen, kann die Acetonkonzentration auf 84%, später auf 86% erhöht werden. Soll auch die β-Carotinfraction gewonnen werden, erfolgt die Elution mit 100% Aceton. Die Fraktionen der aufgereinigten Carotinoide werden direkt in auf Eis stehenden Rundkolben mit ca. 40 ml vorgelegtem Ether aufgefangen. Die wässrige Phase trennt man durch vorsichtiges Ausschütteln mit ca. 100 ml H₂O ab. Nach Waschen der Etherphase wird diese in einen Rundkolben überführt um das Restwasser über Nacht auszufrieren. Am Tag darauf werden dann wie oben beschrieben die Eiskristalle abfiltriert, die reinen Carotinoide vermessen, aliquotiert und trocken bei -20°C gelagert. Die Säule wird mit 100% Aceton farblos gewaschen und im selben Lösungsmittel verschlossen aufbewahrt.

2.3.4.3. Aufreinigung von Chlorophyllen

Die eingefrorene Gesamtchlorophyllfraktion nach der Dioxanfällung wird wasserfrei gemacht, indem die Eiskristalle mit einer Wasserstrahlpumpe über einen vorgekühlten Filter abgesaugt werden. Das Filtrat wird im Rotationsverdampfer eingetrocknet und sofort in 100% Aceton aufgenommen. Um an dieser Stelle **Gesamtchlorophylle** abzuzweigen wird die Chlorophylllösung vermessen, aliquotiert und unter Stickstoff eingetrocknet bei -20°C gelagert.

Um **aufgereinigte Chlorophylle** zu gewinnen, werden sie in der präparativen HPLC über eine RP-Säule (s.o.) getrennt. Dazu wird erst die Säule mit 86% Aceton (mit 0,1 mM HEPES-KOH pH 7,5 und einer Spatelspitze Na-Dithionit/l) äquilibriert. Nun wird die Chlorophylllösung (max. 50 mg) durch Zugabe von H₂O *dest.* auf 86% Aceton eingestellt und maximal 50 ml mit dem Superloop auf die Säule aufgetragen (Programm „Chlorophyllgrad“). Die Elution der reinen Chlorophylle erfolgt mit 86% Aceton, die aber in 2er Schritten erhöht werden kann, wenn die Trennung sehr langsam erfolgt. Die gelbgrüne Chlorophyll b- und die blaugrüne Chlorophyll a-Bande werden direkt in auf Eis stehende Rundkolben mit ca. 40 ml vorgelegtem Ether aufgefangen. Die Abtrennung der wässrigen Phase, das Waschen der Etherphase sowie die Aufbewahrung der getrockneten Pigmente verlaufen wie unter 2.3.3.2 beschrieben.

Aufschlußpuffer: 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM DTT, 330 mM Sorbitol

2.3.5. Photometrische Chlorophyllbestimmung nach Porra (1989)

Ein Aliquot des in 100% Aceton gelösten Chlorophylls wird in 80% Aceton so verdünnt, dass die maximale Extinktion bei den zu messenden Wellenlängen kleiner als 1 ist. Es wird ein Nullabgleich bei 750 nm gemacht um unspezifische Streuung zu vermeiden. Nun wird die Probe bei 646,6 nm und 663,6 nm vermessen und die Chlorophyllmenge nach folgender Formel errechnet:

Chl a =	12,25 A_{663,6} – 2,55 A_{646,6}	[µg/ml]
Chl b =	20,31 A_{646,6} – 4,91 A_{663,6}	[µg/ml]

2.3.6. Photometrische Xanthophyllbestimmung

Zur Bestimmung des Gesamt-xanthophyllgehaltes wird die Probe in 80% Aceton bei 440 nm vermessen und deren Konzentration nach folgender Formel bestimmt:

E (0,24)	[_{440 nm, 1 cm}] = 1 µg/ml
-----------------	--

2.3.7. Pigmentmodifikationen

2.3.7.1. Aufreinigung von Chlorophyllase aus *Phaeodactylum tricornutum*

(modifiziert nach Schoch und Brown, 1987)

Die Extraktion von Chlorophyllase aus der Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* ist recht effektiv, da das Enzym im Extrakt in relativ großer Menge vorhanden ist. *P. tricornutum* ist eine Alge der Klasse *Bacillariophyceae* und ist in die Abteilung der *Heterokontophyta* eingegliedert. Die Anzucht erfolgt in ASP/m Medium, dessen Zusammensetzung auf dem ASP Medium von Provasoli *et al.* (1957) basiert. *P. tricornutum* Zellen werden in 3,5 l ASP/m Medium für ca. 2 Wochen bei 22°C und einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 16:8 Stunden geschüttelt. Die Ernte erfolgt durch Zentrifugation bei 3000 x g (Beckman GPR Centrifuge). Das Pellet wird mit 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8 gewaschen. Es folgt eine sukzessive Extraktion mit Aceton: 1 x mit 90%, 2 x mit 80%, 1 x mit 70% Aceton in Chlorophyllase-Puffer. Das finale Pellet (Acetone Powder) wird bei RT getrocknet. 1 l Algenkultur ergibt ca. 100 mg getrockneten Puder. Die Extraktion des Enzyms erfolgt durch Rühren bei 10°C über Nacht: je 100 mg Puder wird dazu in 10 ml Chlorophyllase-Puffer aufgenommen. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 12000 x g wird der Überstand mit Centrikons (10 kD cutoff) bis auf 60% des Ausgangsvolumens aufkonzentriert. Der Chlorophyllase-Extrakt kann nun bei -20°C für mehrere Wochen oder dauerhaft nach Schockgefrieren bei -80°C gelagert werden.

Chlorophyllase-Puffer: 0,5 M NaCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl pH 8

ASP/m Medium: 86 mM NaCl, 8 mM Tris, 21 mM KCl, 8,1 mM MgSO₄ x 7 H₂O, 11,8 mM NaNO₃, 0,58 mM K₂HPO₄, 0,16 mM H₃BO₃. Die Lösung wird mit konz. H₂SO₄ auf pH 7,7 eingestellt; danach werden 2,72 mM CaCl₂ sowie je 1/1000 Volumen Eisen-(III)-Lösung und die Spurenelementlösungen A und B hinzugegeben.

Eisen-(III)-Lösung: 4,65 mg/ml Titriplex III, 3,3 mg/ml FeCl₃ x 6 H₂O

Spurenelementlösung A: 30 mg/ml Titriplex III, 4,05 mg/ml MnCl₂ x 4 H₂O, 0,03 mg/ml ZnCl₂

Spurenelementlösung B: 0,024 mg/ml CaCl₂ x 6 H₂O, 0,012 mg/ml Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,006 mg/ml CuCl₂ x 2 H₂O

2.3.7.2. Chlorophyllase-Assay

(modifiziert nach Schoch und Brown, 1987)

3 ml des Chlorophyllase-Extraktes werden zu mindestens 100 µg Substrat in 1 ml Aceton gegeben (30% Aceton Endkonzentration). Der Ansatz wird ca. 90 Minuten bei RT inkubiert und die Reaktion schließlich durch Erhöhen der Acetonkonzentration auf 70% gestoppt. Nach Zentrifugation (2 min; 20000 x g; RT) wird der grüne Überstand auf eine zuvor mit 70% Aceton äquilibrierte C-18 SEP-PAK Säule (Waters) gegeben. Chlorophyllide finden sich im Durchfluss mit 70% Aceton, die Chlorophylle

können mit 90% Aceton von der Säule eluiert werden. Die Konzentration kann photometrisch nach untenstehender Formel bestimmt werden. Der Extinktionskoeffizient für Chlorophyll und Chlorophyllid ist gleich (Strain & Svec, 1966).

$$\text{Chl a} = 11,42 \times \text{OD}_{663} \text{ [mg/l]}$$

Die C-18 SEP-PAK Säule kann durch Waschen mit mehreren Säulenvolumen 100% Aceton regeneriert werden. Dabei sollte die Laufrichtung mehrmals umgekehrt werden. Nach Trocknen des Materials kann sie bis zur erneuten Verwendung bei RT gelagert werden.

2.3.7.3. Phäophytinisierung von Chlorophyllen

2 mg Chlorophyll a werden in 4 ml Diethylether gelöst. Dazu werden 4 ml 10%-iger HCl gegeben und der Ansatz gemischt, bis ein Farbumschlag von blaugrün nach braunrot erkennbar ist. Die Etherphase wird nun mehrfach mit Wasser gewaschen, wasserfrei gemacht und einrotiert (vgl. 2.3.4).

2.3.7.4. Insertion von Zn²⁺

1 mg Chlorophyll a oder Phäophytin a wird in 2 ml Chloroform gelöst. Nach Erwärmung auf 35°C wird unter Schwenken 1,5 ml gesättigte Zinkacetat-Lösung (in Chloroform) dazugetropft. Die Lösung wird dann eine Stunde bei 35°C inkubiert. Das Zn-Phäophytin wird nun durch Zugabe von 2 ml Ether und 5 ml Wasser in die Etherphase überführt, diese wasserfrei gemacht und einrotiert.

2.3.7.5. Synthese von Phäophorbid / Zn-Phäophorbid

1 mg Chlorophyll a bzw. Zn-Chlorophyll a wird in 1 ml Trifluoracetat gelöst und unter N₂-Fluss 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Phäophorbid wird in die Etherphase überführt, diese mehrfach mit Wasser gewaschen, wasserfrei gemacht und einrotiert.

2.3.7.6. Synthese von Bakteriochlorophyll und Insertion von Kupfer

Bakteriochlorophyll wurde aus *Rhodobacter sulfidophilus* isoliert. Die Anzucht der Zellen, Isolation des Bakteriochlorophylls a wie auch die Kupfer-Insertion wurden von Jens Rupprecht durchgeführt (vgl. Diplomarbeit Jens Rupprecht, 1998; Svec 1991; Hartwich *et al.*, 1998).

2.3.8. Destillation von Ether

Um Ether von Peroxiden zu befreien, wird er kurz vor Gebrauch destilliert. Dazu wird an einer Rückfluss-Destille zunächst die Kühlung angeschaltet und ein 2l-Rundkolben zu 2/3 mit Ether befüllt. In den Rundkolben werden zusätzlich ca. 20 KOH-Plätzchen gegeben, die HO_2^- als K-Salz fällen. Das Heizbad wird nun auf Stufe 3 gestellt und der Ether wird 2 Stunden mit Rückfluss gekocht. Danach beginnt die eigentliche Destillation, das Destillat wird aufgefangen und kann im explosionsgeschützten Kühlschrank bis zu 2 Wochen aufbewahrt werden.

2.3.9. Destillation von technischem Aceton

Für Arbeiten mit Pigmenten wird i. d. R. wasserfreies p.A. Aceton oder technisches, zusätzlich destilliertes Aceton verwendet. Das technische Aceton wird durch die Destillation von Restwasser befreit. Hierfür wird ein 2 l Rundkolben zu 2/3 mit Aceton gefüllt. Hinzu kommen ca. 20 Siedesteinchen. Der Rundkolben wird in einen Heizpilz gesetzt, das digitale Thermometer sowie die Kühlfalle (4°C) der Rückfluss-Destille werden angestellt. Das Heizelement („isopod“) wird auf Position 5 eingestellt, bis das Aceton nach ca. 35 Minuten zu sieden beginnt. Der Vorlauf der ersten 20 Minuten wird aufgefangen und als Spülaceton verwendet. Danach beginnt die eigentliche Destillationszeit von ca. 2-3 Stunden. Die Temperatur sollte bei 57,6°C liegen. Die Destillation wird abgebrochen, wenn noch ca. 50 ml Flüssigkeit über den Siedesteinen steht.

2.3.10. Rekonstitution

Das Prinzip der Rekonstitution pigmentbindender Proteine ist die Rückfaltung des denaturierten Proteins mit Pigmenten in seinen nativen Zustand: das denaturierte Protein wird in Gegenwart einer geeigneten Detergengkonzentration oder eines chaotropen Agens mit einer Pigmentmischung in Detergens zusammengebracht. Das Protein faltet sich nun mit gleichzeitiger Pigmentbindung. Zur Rückfaltung der in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden verschiedene Rekonstitutionsmethoden verwendet, die im Folgenden näher erläutert werden sollen.

2.3.10.1. Rekonstitution durch Detergenswechsel

Die Standardrekonstitution für das LHCP ist die Rekonstitution durch Detergenswechsel und anschließender KCl-Fällung (Paulsen *et al.*, 1993), in die 0,4 µg/µl Apoprotein, 1,0 µg/µl Chlorophyll (Chl a/Chl b = 1) und 0,15 µg/µl Xanthophyll eingesetzt werden. Das Protein in 2% Dodecylsulfat (DS) wird mit einem Überschuss an Pigmenten vermischt. Durch Überführen in das nicht-ionische Detergens Octyl-β-D-glucopyranosid (OG) werden Protein und Pigmente aus den DS-Mizellen über DS-OG-Mischmizellen in OG-Mizellen gezwungen. Die physikalische Umgebungsveränderung im

Rekonstitutionsansatz induziert die Faltung des Proteins mit gleichzeitiger Pigmentbindung. Durch Zugabe von KCl fällt das DS als schwerlösliches Kaliumsalz aus.

Zu 25 µl 2x Solubilisierungspuffer werden 20 µg LHCP in 25 µl H₂O *dest.* gegeben. Die Proteinlösung wird nun 1 Minute bei 100°C im Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen werden 5 µl 10 mM DTT hinzugegeben. Nun wird die Proteinlösung unter ständigem Mischen zu 50 µg Totalextrakt in 5 µl Ethanol gegeben und der Ansatz sofort 30 Sekunden kräftig gemischt. Anschließend werden 7,5 µl 10% OG (1% Endkonzentration) hinzugegeben und nach kräftigem Mischen 5 Minuten bei RT inkubiert. Nun wird das DS durch Zugabe von 7,5 µl 2 M KCl (0,2 M Endkonzentration) für 20 Minuten auf Eis ausgefällt. Das Präzipitat wird 8 Minuten bei 18500 x g und 4°C (12000 rpm, Hettich Tischzentrifuge) abzentrifugiert. Der Überstand enthält gefaltete Komplexe und ungebundenes Pigment in 1% OG und kann nun kurz auf Eis oder bei -20°C gelagert werden.

2 x Solubilisierungspuffer: 200 mM Tris-HCl pH 9,0, 25% [w/v] Saccharose, 4% [v/v] LDS, 10 mM ε-Aminocaprinsäure, 2 mM Benzamidin.

2.3.10.2. Rekonstitution mit Frier-Tau-Zyklen

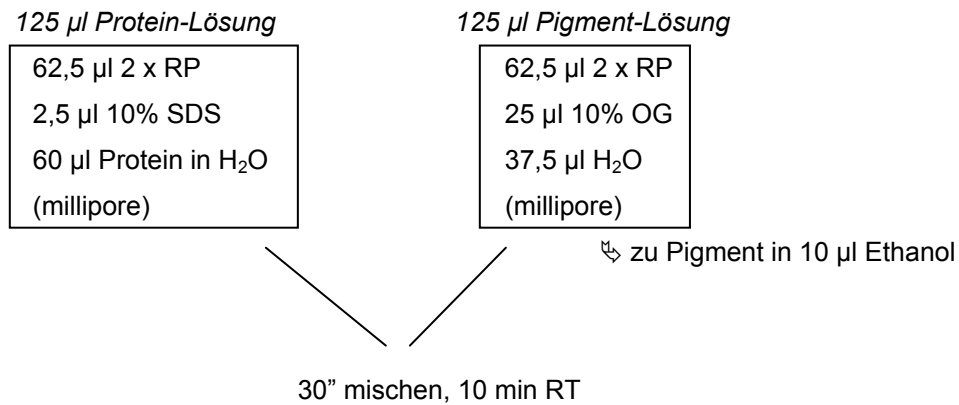
Die Rekonstitution mit 3 aufeinander folgenden Frier-Tau-Zyklen wurde vor der Detergenswechsel-Rekonstitution für die Rückfaltung des LHCP verwendet (Paulsen *et al.*, 1990). Hier wurde sie in variiertes Form für Rekonstitutionsversuche am OHP benutzt.

25 µl Rekonstitutionspuffer (A₂₈₀-Puffer, vgl. 2.3.2.1) werden mit 10 µg Protein in 25 µl H₂O *dest.* und 2,5 µl 100 mM DTT versetzt. Der Ansatz wird nun 2 Minuten bei 100°C im Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen werden abermals 2,5 µl 100 mM DTT zugegeben. Zu dieser Proteinlösung werden unter kräftigem Mischen 50 µg Totalextrakt in 5 µl Ethanol geben. Von den sich nun anschließenden 3 Frier-Tau-Zyklen findet einmal Einfrieren ü.N. statt, die beiden anderen dauern mindestens 1 Stunde. Das Auftauen der Lösung wird 2 mal für ca. 10 Minuten bei RT, das letzte Mal jedoch auf Eis durchgeführt.

2.3.10.3. Rekonstitution durch Verdünnung aus SDS

Die Rekonstitution durch Verdünnung aus SDS wurde der „rapid mixing reconstitution“ nachempfunden (Booth & Paulsen, 1996). Das Prinzip ist, Protein in 1% SDS unter ständigem Mischen zu Pigment in 1% OG zu geben, wobei die SDS-Konzentration auf 0,2% verdünnt wird. Die Rekonstitution erfolgt während der Herabsetzung der SDS-Konzentration.

Die Vorgehensweise der Rekonstitution des LHCP durch Verdünnen aus SDS ist im Folgenden schematisch dargestellt.



Es wurden in dieser Arbeit 0,4 µg/µl Protein und ein 3-facher stöchiometrischer Pigmentüberschuss (bezogen auf Chl a im Totalextrakt) eingesetzt. Nach der Inkubation wird der Rekonstitutionsansatz 2 Minuten bei 25200 x g (14000 rpm, Hettich Tischzentrifuge) und 4°C zentrifugiert, um mögliche Aggregate zu pelletieren.

2 x Rapid Mixing Rekopuffer (RP): 200 mM Lithiumborat pH 9,0, 25% [w/v] Saccharose, + frisch 2 mM DTT oder 2-ME (für LHCP). Lithiumborat wird durch Titration von Borsäure mit Lithiumhydroxid hergestellt.

2.3.10.3.1. Rekonstitution von PsbS

Für die Rekonstitutionsversuche am PsbS-Protein wurde die Methode durch Verdünnung aus SDS modifiziert. 150 µg Protein in 1% LDS werden in 125 µl 100 mM Lithiumborat pH 7,5, 0,2% LDS überführt. 61 µg mit Carotinoiden angereicherter Totalextrakt wird in 10 µl Ethanol p.A. gelöst (Totalpigmentextrakt [Chl a/b = 3/1, Nx/Vx/Lu/Car = 51/21/12/1] wird durch Zugabe von Gesamtcarotinoiden auf den molaren Überschuss von 10 Chl a und 5 Lutein pro PsbS eingestellt und wird im Folgenden als supplementierter oder angereicherter Totalextrakt bezeichnet). Das Pigmentaliquot wird unter Mischen zu 125 µl 2% OG, 100 mM Lithiumborat gegeben. Nun wird der Protein-Ansatz unter ständigem Mischen zum Pigment-Ansatz gegeben und alles weitere 30 Sekunden durchmischt. So wird eine Verdünnung auf 0,3% SDS in 1% OG erreicht. Der Rekonstitutionsansatz wird anschließend 10 Minuten bei RT inkubiert. Eventuelle Aggregate werden durch Zentrifugation (2 min, 4°C, 25200 * g = 14000 rpm, Eppendorf Tischzentrifuge) pelletiert.

2.3.10.4. Rekonstitution von WSCP-his durch Verdünnung aus Guanidinium Hydrochlorid

Die Rekonstitutionsmethode aus Guanidinium Hydrochlorid (GuHCl) wurde nach Yang variiert. GuHCl ist ein chaotropes Reagens, welches das Protein denaturiert. Aus komplett denaturiertem Zustand wird das Protein dann unter gleichzeitiger Bindung von Pigmenten in 1% OG überführt, dabei wird die Konzentration des GuHCl stark verdünnt.

Ca. 300 µg WSCP in 10 µl 50 mM NaP pH 7,4 werden mit einer kleinen Spatelspitze festem GuHCl versehen. Es wird gerade soviel GuHCl verwendet, dass das Protein in Lösung geht. In einem zweiten 1,5 ml Reagiergefäß werden 25 µl 2 x Rekopuffer mit 12,5 µl H₂O (millipore) und 12,5 µl 10% OG versetzt und gut gemischt. 100 µg Pigment (10 x molarer Überschuss über das Protein) wird in 10 µl 100% Ethanol vorgelöst, dazu kommt unter 30-sekündigem starkem Mischen das Gemisch aus Rekopuffer, Wasser und OG. Zu diesem Rekonstitutionsansatz kommt schließlich ebenfalls unter Mischen das Protein in GuHCl. Nach weiteren 30 Sekunden Mischen wird der Ansatz 5 Minuten bei RT inkubiert und anschließend mit 1 x Rekopuffer auf 1% OG Endkonzentration verdünnt. Abschließend erfolgt Zentrifugation (2 min, 10 000 * g, 4°C) zur Abtrennung möglicher Aggregate. Die Rekonstitutionsprodukte werden mittels detergensfreier oder nativer PAGE analysiert (vgl. 2.3.12).

Rekonstitutionsexperimente für anschließende Auftrennung auf Saccharosedichtegradienten (vgl. 2.3.13) werden mit 1 mg WSCP-his wie oben beschrieben durchgeführt. Allerdings wurde mit 100 mM Lithiumborat pH 9,0 und ohne Zugabe von Saccharose auf 1% OG verdünnt, um ein Einsinken der Probe in den Gradienten zu vermeiden.

2 x Rekopuffer: 200 mM Lithiumborat pH 9,0, 25% [w/v] Saccharose

2.3.10.5. Rekonstitution von WSCP-his auf der Nickel-Säule

Proteine, die einen Hexahistidylrest tragen, können an Nickel-Sepharose immobilisiert werden. Ni²⁺-Ionen binden über die Iminodiessigsäure-Gruppe der Sepharose an das Säulenmaterial, bei dieser Chelatbindung werden drei von sechs möglichen Koordinationsstellen des Nickel-Ions besetzt. Die Anlagerung des His-Tags erfolgt über die drei noch freien Stellen. Bei der Elution macht man sich die Tatsache zunutze, dass Imidazol wegen seiner strukturellen Ähnlichkeit zum Histidin um die Bindungsstelle konkurriert und somit das Protein von dieser verdrängt.

Vorbereiten der Säule

Da die verwendete Chelating Sepharose eine Bindekapazität von ca. 1 µg Protein pro µl Sepharose-lösung aufweist, wird für die Rekonstitution von 1 mg WSCP-his ein 10 ml BIO-RAD Säulchen mit Fritte mit 1 ml Sepharose gepackt. Nachdem das Material sich abgesetzt hat, wird es mit 2-fachem Säulenvolumen H₂O *dest.* gespült. Anschließend wird die Säule mit 2-fachem Volumen 0,3 M NiCl₂ beladen, die Säule nimmt eine grünlich-blaue Farbe an. Überschüssiges NiCl₂ wird mit 5-fachem Volumen Tris-HCl pH 7,5 von der Säule gewaschen, die Farbe ändert sich nach hellblau. An dieser Stelle sollte beachtet werden, dass Nickel-Abfall giftig ist und stets getrennt entsorgt werden muss.

Rekonstitution

Die Rekonstitution von an Nickel-Sepharose immobilisiertem WSCP-his wurde nach Rogl *et al.* (1998) modifiziert. Sie ist Aufreinigungsschritt des Proteins und Bindung des Pigmentes an das

immobilisierte Protein zugleich. Zunächst wird 1 mg WSCP-his aus dem Überstand nach der French Press (vgl. 2.3.1.4) auf die vorbereitete Nickelsäule gegeben und kurz inkubiert. Bakteriell Protein ohne His-Tag bindet nicht an die Säule und wird in diesem Schritt mit einem Säulenvolumen 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,8) entfernt. Anschließend werden 200 µg Pigment (bezogen auf Chl a, 5-facher molarer Überschuss über das Protein) in 10 µl 100% Ethanol vorgelöst und unter Rühren in 500 µl OG-Puffer überführt. Die Pigmente in OG werden dann auf die Säule gegeben und nach kurzem Durchmischen des Säulenmaterials mit der Lösung 45 Minuten bei RT inkubiert. Um nach der Inkubation ungebundenes Pigment zu entfernen, wird so lange mit OG-Puffer nachgewaschen, bis der Durchfluss farblos ist. Um nun die Säule detergensfrei zu machen, wird mit mindestens 10 Volumen 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,8 gewaschen, dabei wird die Sepharose mehrmals kurz aufgewirbelt. Für die Elution gibt man 1–1,5 Säulenvolumen Elutionspuffer auf die Säule, lässt ihn einlaufen und fängt dann das grüne Eluat auf.

Regeneration der Säule

Die Sepharose kann wieder verwendet werden, wenn man sie nach Gebrauch regeneriert. Dazu werden gebundene Pigment- und Proteinreste mit 2-fachem Säulenvolumen 2% SDS [w/v], 300 mM Imidazol von der Säule gespült. Anschließend wird mit 4-fachem Volumen H₂O *dest.* gewaschen, bevor die gebundenen Ni²⁺-Ionen mit 2-3-fachem Volumen 0,5 M EDTA von der Säule gespült werden. Nach Nachwaschen mit 4-fachem Volumen H₂O *dest.* wird der Nickel-Abfall getrennt entsorgt und die Sepharose mit 20%-igem Ethanol gewaschen, bevor sie in einen Vorratsbehälter gegeben wird.

OG-Puffer: 100 mM Natriumphosphat pH 7,8, 1% OG [w/v], 12,5% [w/v] Saccharose

Eluatpuffer: 10 mM Natriumphosphat pH 7,8, 300 mM Imidazol

2.3.11. Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen

(nach Monika Meyer)

Fluoreszenzfarbstoffe werden aus verschiedenen Gründen zum Markieren von Proteinen verwendet. Einerseits können Proteine durch Anregung der gebundenen Farbstoffe visualisiert werden. Andererseits können markierte Proteine auch für Rekonstitutionsexperimente verwendet werden, um im Komplex durch Anregung des Farbstoffes möglicherweise Energietransfer auf ein gebundenes Pigment messen zu können. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) sowie Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC) sind Farbstoffe, die an Aminogruppen binden. Findet die Markierung von Proteinen bei pH 7,0 statt, ist aufgrund ihres veränderten pK-Wertes nur die N-terminale Aminogruppe protoniert und damit für den Farbstoff zugänglich.

Für die N-terminale Markierung von Proteinen mit FITC oder TRITC werden zunächst 50 µg Protein des zu markierenden Proteins in 12,5 µl 1% LDS aufgenommen und 1 Minute bei 100°C gekocht. Nun werden 112,5 µl 20 mM NaP pH 7,0 zugegeben sowie 5 µl Farbstoff (10 mg/ml, in DMF

vorgelöst) in 99,6% Ethanol. Diese Menge entspricht einem 64-fachen Farbstoffüberschuss. Die Markierung erfolgt eine Stunde bei 15°C. Wenn ein geringerer Farbstoffüberschuss verwendet wird, sollte die Markierungsdauer verlängert werden. Die Reaktion wird schließlich mit 12,5 µl 10% Aminoethanol gestoppt. Um das markierte Protein weitgehend von freiem Farbstoff zu trennen wird es ethanolisch gefällt. Dazu vermischt man den Ansatz mit ½ Volumen Ethanol p.A. und inkubiert ihn 30 Minuten auf Eis. Nach Zentrifugation (15 min, 4°C, 25000 * g = 14000 rpm, Hettich Tischzentrifuge) wird das Pellet 2-mal mit 70% Ethanol gewaschen, zentrifugiert (5 min, 4°C, 25000 * g), getrocknet und das Protein in 1% LDS wieder resuspendiert.

2.3.12. Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)

Die diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen. Bei der denaturierenden SDS-PAGE verleiht das Detergens den Proteinen eine negative Nettoladung, so dass die Größe das einzige Trennkriterium darstellt. Je nach Wahl des Puffers können die Trennbedingungen der Elektrophorese aber auch schwach denaturierend oder nativ gewählt werden (s.u.). Das Gel setzt sich zusammen aus Acrylamid und N,N'-Methylen-Bisacrylamid, die durch Zugabe von Katalysatoren zu einer netzartigen Matrix auspolymerisieren. Das Bisacrylamid fungiert bei dieser Reaktion als Quervernetzer der Acrylamidketten. Der Katalysator APS bildet in wässriger Lösung Sulfatradikale, die die radikalische Polymerisation des Gels starten. Durch TEMED werden die gebildeten Radikale stabilisiert.

Durch folgende Formeln können die optimalen Trennparameter errechnet werden.

$$T = (X+Y) * 100 / V \qquad C = Y * 100 / (X+Y)$$

T = totale Acrylamidkonzentration [%]

Y = Masse N,N'-Methylen-Bisacrylamid [g]

C = Vernetzungsgrad [%]

V = Volumen [ml]

X = Masse Acrylamid [g]

Die Porengröße und damit die Trenneigenschaften des Gels kann durch Erhöhen des Vernetzungsgrades wie auch der Acrylamidkonzentration verändert werden. In dieser Arbeit wurden z.B. für größere Proteine wie WSCP-Multimere (76 kD) oder das MBP-WSCP 8–10%-ige Gele (Acrylamid/Bisacrylamid = 30/1) verwendet, für Proteine wie Sep (22 kD) oder LHCP (25 kD) 15%-ige Gele, für OHP mit 14 kD jedoch 18%-ige Gele. Weiter können die Laufbedingungen eines Polyacrylamid-Gels durch die Wahl des Puffers beeinflusst werden:

SDS-Puffer: 50 mM Tris, 384 mM Glycin, 1 mM EDTA, 0,1% SDS;
wird für voll denaturierende Gele verwendet.

LDS-Puffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,5 mM EDTA, 0,1% LDS;

enthält anstelle des SDS das Lithiumsalz, was bei 4°C nicht ausfällt. Somit kann der LDS-Puffer für schwach denaturierende Gele unter Kühlung bei 4°C verwendet werden.

Deriphat Puffer: 0,15% Deriphat, 48 mM Glycin, 12 mM Tris
 schafft mit dem Detergens Deriphat weniger stringente Bedingungen, d.h. Pigment-Protein-Komplexe bleiben länger stabil (Peter & Thornber, 1991).
 Die Gele werden bei 4°C gekühlt.

Detergensfreier Puffer: 50 mM Tris, 384 mM Glycin, 1 mM EDTA
 wird für native Gele verwendet, auf denen lösliche Proteine aufgetrennt werden sollen.

Das Polyacrylamid-Gel setzt sich wie folgt zusammen:

Trenngel	Sammelgel
8%, 10%, 15%, 18% Polyacrylamid (Acrylamid/Bisacrylamid = 30/1)	4,5% Polyacrylamid (Acrylamid/Bisacrylamid = 30/1)
10% Glycerin	10% Glycerin
400 mM Tris-HCl pH 8,8	130 mM Tris-HCl pH 6,8
0,07% APS	0,05% APS
0,05 TEMED	0,05 TEMED

Die Gießkammer für 5 bzw. 10 Gele wird wie folgt zusammengebaut: zuerst werden alle mit Acrylamid in Kontakt kommenden Flächen mit 100% Ethanol entfettet. Dann werden Aluminiumoxidplatten, Spacer und Glasplatten in dieser Reihenfolge in die Kammer gelegt, wobei zwischen 2 sich auf ganzer Fläche berührende Platten ohne Spacer ein Wachspapierstück gelegt wird. Die Trenngel-Lösung wird zusammenpipettiert und mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast, dann werden APS und TEMED zugegeben. Die Trenngel-Lösung wird nun bis auf eine Höhe von 5–5,5 cm in die Gießkammer gegeben. Um die Oberfläche und damit die spätere Grenzschicht zum Sammelgel zu glätten, wird sie mit Wasser überschichtet. Nach ca. 1 Stunde ist das Gel polymerisiert. Nun wird das Wasser abgegossen und die vorbereitete und entgaste Sammelgel-Lösung bis zum Rand der Gießkammer auf das Trenngel gegossen. Anschließend werden die Kämme vorsichtig eingesetzt; das Sammelgel polymerisiert innerhalb einer weiteren Stunde. Die gegossenen Gele können nun bis zu 2 Wochen in Folie eingewickelt im Kühlschrank gelagert werden.

Die aufzutrennenden Proteine werden zunächst bei ca. 40 V im Sammelgel zu einer scharfen Bande fokussiert. Nachdem die Grenze zum Trenngel passiert ist, kann die Elektrophorese für SDS-PAGE bei ca. 150 V, für schwach denaturierende und native Gele bei ca. 70–90 V durchgeführt werden. Die Lauffront wird durch das Bromphenolblau markiert. Zum Größenvergleich wird ein Marker mit auf das Gel aufgetragen.

Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Proteinbanden mit Hilfe des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie Brilliant Blue direkt im Gel angefärbt. Die Gele werden für 15 bis 20 Minuten in einer Gerdabox auf dem Schüttler mit der Coomassie-Färbelösung inkubiert. Die Entfernung des überschüssigen Farbstoffes erfolgt anschließend in zwei Schritten. Zunächst wird das gefärbte Gel 20 Minuten im ersten Entfärber inkubiert. Anschließend verbleibt das Gel solange im zweiten Entfärber, bis der Hintergrund vollständig entfärbt ist und nur noch die blauen Proteinbanden zu erkennen sind. Zur langfristigen Lagerung wird das Gel zwischen zwei Einmachfolien auf dem Geltrockner bei Hitze im Vakuum getrocknet.

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

SDS 7-Marker:

Rinderserumalbumin	66 kD
Ovalbumin	45 kD
NADPH	36 kD
Carboanhydrase	29 kD
Trypsinogen	24 kD
Trypsin-Inhibitor (soy bean)	21 kD
α -Lactalbumin	14,2 kD

Serva 5-Marker:

Carboanhydrase	29 kD
Trypsin-Inhibitor (soy bean)	21 kD
Cytochrom C	12,5 kD
Trypsin-Inhibitor (Rinderlunge)	6,5 kD

Coomassie-Färbelösung: 1,75 mg/ml Coomassie Brilliant Blue (Serva); 50% [v/v] Ethanol; 7% [v/v]

Eisessig

1. Entfärber: 10% Ethanol
7% Eisessig

2. Entfärber: 10% Eisessig

2.3.13. Saccharosedichtegradienten Ultrazentrifugation

Die Ultrazentrifugation durch kontinuierliche Dichtegradienten erlaubt die Auftrennung von Molekülen nach ihrer spezifischen Dichte. Sie wurde hier verwendet, um Protein-Pigment-Komplexe im präparativen Maßstab von freiem Pigment zu trennen. Die Linearität der Dichtegradienten wird durch 3-faches Einfrieren und Auftauen erreicht, wobei man sich die unterschiedlichen Schmelzpunkte der Saccharoselösung und des Wassers zunutze macht. Beim Einfrieren verdrängt die schwerere Zuckerlösung sich bildende Wasserkristalle nach oben. Das mehrfache Wiederholen dieser Zyklen schafft eine gewisse Linearität der Dichte.

Die in dieser Arbeit verwendeten Trennparameter von rekonstituierten Komplexen zu Abtrennung freien Pigmentes sind im Folgenden zusammengefasst (Tab. 2.4).

Protein	LHCP-Monomere	OHP	PsbS	WSCP-his
Gradient	0,5 M Saccharose; 5 mM Tricine pH 7,5, 0,1% LM	0,6 M Saccharose; 5 mM Tricine od. NaP pH 7,5, 0,1% LM	0,4 M Saccharose; 5 mM NaP pH 7,5, 0,1% LM	0,4 M Saccharose; 5 mM NaP pH 7,5, 0,1% LM/ detergensfrei
Lauf	16 h, 4°C, 400000 x g (54000 rpm, Rotor SW60Ti)	16 h, 4°C, 400000 x g (54000 rpm, Rotor SW60Ti)	16 h, 4°C, 400000 x g (54000 rpm, Rotor SW60Ti)	16 h, 4°C, 175000 x g (35000 rpm, Rotor SW60Ti)

Tab. 2.4: Übersicht über die Trennbedingungen für rekonstituierte Proteine im Saccharosedichtegradienten.

Ein aus einer 0,5 molaren Saccharoselösung hergestellter Gradient hat einen theoretischen Dichtebereich von 0 bis 1 M Saccharose, bei einem Gradienten aus 0,4 M Saccharose liegt dieser Bereich bei 0 bis 0,8 M. Nach dem Lauf wurden die pigmentierten Banden mit Hilfe einer 1 ml-Spritze mit langer Kanüle vorsichtig abgesaugt und bis zur weiteren Verwendung in 1,5 ml Reaktionsgefäßen auf Eis gelagert.

2.3.14. Butanolextraktion von Pigmenten aus Gelschnipseln

Um Pigmente aus PAA Gelbanden quantifizieren zu können, werden sie mit 2-Butanol extrahiert. Der pigmentierte Bereich wird mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und eingefroren. Der gefrorene Gelschnipsel wird mit einem Plastikstößel zerrieben und mit 100 µl H₂O aufgeschlemmt. Nun werden 66 µl 2-Butanol hinzugegeben und alles vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von 33,5 µl 5 M NaCl und abermaligem Mischen wird der Ansatz 2 Minuten bei 12000 rpm im Kühlraum zentrifugiert. Nach der Zentrifugation hat sich die obere Butanolphase, die die Pigmente enthält, von der wässrigen Phase mit den Gelresten abgetrennt. Für die Analyse über HPLC (high performance liquid chromatography) wird die Butanolphase 1:1 bis 1:2 mit 70%-igem Aceton (gepuffert mit 0,2 mM HEPES pH 7,5) verdünnt. Pro Lauf werden 25 µl der Probe in eine Hamilton Spritze gezogen und die Probenschleife damit sehr langsam befüllt (vgl. 2.3.16).

2.3.15. Butanolextraktion von Pigmenten aus Gradientenbanden

(variiert nach Martinson & Plumley, 1995)

Zu 100 µl Probe werden 67 µl 2-Butanol gegeben und alles vorsichtig vermischt. Anschließend werden 33 µl 5 M NaCl hinzugefügt und der Ansatz nach vorsichtigem Mischen 1 Minute bei 4°C und 25200 x g (14000 rpm, Hettich Tischzentrifuge) zentrifugiert. Nun kann eine deutliche Phasentrennung im Reaktionsgefäß beobachtet werden; die obere Butanolphase wird abgenommen und der Ansatz mit 33 µl 2-Butanol nachextrahiert. Nach dem nächsten Zentrifugationsschritt (1 Minute bei 4°C und 25200 x g) werden die Butanolphasen vereinigt.

Zur Butanolextraktion aus WSCP-his Komplexen, die über eine Nickelsäule aufgereinigt wurden, muss der Komplex zur Destabilisierung zunächst auf 1% [w/v] SDS gebracht und gekocht werden (2 min). Anschließend wird Butanol zugegeben und wie oben zentrifugiert. Auf Zugabe von NaCl wird i.d.R. verzichtet, um ein Ausfallen des SDS als schwerlösliches Natriumsalz zu verhindern. Sollte sich jedoch keine Phasentrennung einstellen, können gegebenenfalls geringe Mengen NaCl zugegeben werden, der Ansatz wird dann aber bei RT gehalten.

2.3.16. High-performance liquid chromatography (HPLC)

Bei der HPLC-Analyse werden die Pigmente auf einer Reversed Phase (RP) Säule mit geeignetem Laufmittel nach ihrer Hydrophobizität aufgetrennt. Diese Methode kann sowohl analytisch zur Quantifizierung als auch präparativ zur Aufreinigung einzelner Pigmente durchgeführt werden. Direkt vor der HPLC-Analyse wird zu den mit 2-Butanol extrahierten Pigmenten mindestens ½ Volumen 80%-iges Aceton (gepuffert mit 0,2 mM HEPES pH 7,4) gegeben. Sollen die Carotinoide quantitativ untersucht werden ist es ratsam, statt 80%-igem 70%-iges Aceton zu verwenden; die Spektren von Neoxanthin bzw. Violaxanthin zeigen so schmalere Peaks.

Die Auftrennung der Pigmente erfolgte auf einer RP-Säule (Cromolith SpeedROD RP-18e 50 -4,6) über einen Zeitraum von 6,5 Minuten (Methode Chromolith) und mit einem linearen Gradienten von 30% bis 70% Aceton. Die eluierten Banden wurden über die Absorption bei 440 nm detektiert. Die Chlorophylle wurden mit Hilfe von Eichgeraden basierend auf dem Algorithmus nach Porra (1989) quantifiziert, für Carotinoide wurde der Extinktionskoeffizient nach Britton (1995) verwendet.

2.3.17. Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die Isoelektrische Fokussierung ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Nettoladung in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die unterschiedlich geladenen Proteine migrieren in einem pH-Gradienten zu dem pH-Wert, an dem sie keine Nettoladung besitzen (isoelektrischer Punkt). Der pH-Gradient wird mit sog. Ampholyten aufgebaut, das sind amphoterische Moleküle von geringem Molekulargewicht, die in einem elektrischen Feld ebenfalls zu ihrem isoelektrischen Punkt wandern. Je nach Wahl der Detergentien handelt es sich bei der IEF um eine relativ schonende Methode, mit der auch native intakte Protein-Pigment-Komplexe aufgetrennt werden können.

Vorbereiten der Gelmatrix

In dieser Arbeit wurden aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* PCC 6803 isolierte Thylakoide (isoliert von Christiane Funk) mit einer präparativen IEF aufgetrennt. Da die präparative Fokussierung wegen der späteren Extraktion der Komplexe in einer Stärkematrix stattfindet, wird zunächst diese Gelmasse vorbereitet. Für ein 25,5 x 10 x 0,5 cm großes Gelbett werden 97 ml H₂O (Millipore) mit 5 ml Ampholyten pH 3-9, 1 g Glycin und 1,2 ml 10% LM versetzt. Unter langsamem

Rühren werden nun nach und nach 4 g Ultrodex hinzugegeben. Anschließend werden in das Gelbett an jede schmale Seite so viele Streifen aus Filterpapier (0,5 x 9,5 cm) gegeben, bis sie mit der Oberkante des Gelbettes abschließen. Die Filterpapiere werden dann mit 2% Ampholyten in H₂O (Millipore) angefeuchtet. Nun wird die Gelmasse in das Gelbett gegossen. Dabei sollten Luftblasen vermieden werden, gegebenenfalls kann man diese mit einem Spatel vorsichtig entfernen. Die noch sehr feuchte Masse trocknet anschließend für ca. 1–1,5 Stunden unter dem Abzug; die Oberfläche sollte matt, jedoch nicht brüchig erscheinen.

Solubilisieren der Thylakoide

500 µl Thylakoide aus Cyanobakterien (Mutante PSI⁻, PSII⁻: 80 µg/ml Chlorophyll; Wildtyp 1,6 mg/ml Chlorophyll) werden mit 1080 µl Cyanothylakoidpuffer (2 mM Mes-NaOH pH 6,4, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 20% [v/v] Glycerol; dazu frisch 1 mM PMSF, 5 mM Benzamidin) und 170 µl 10% LM versetzt und für eine Stunde auf Eis unter langsamem Rühren solubilisiert.

Gellauf und Extraktion der Banden

Anschließend werden die solubilisierten Thylakoide unter Zuhilfenahme einer geeigneten Schablone auf die Gelmatrix aufgetragen und so mit ihr vermischt, dass ein klar begrenzter Spot entsteht. Die Elektroden werden festgelegt, indem auf je eine Seite 0,1 M NaOH (-) und 0,1 M H₃PO₄ (+) gegeben wird. Die Proben werden für 30 Minuten vorfokussiert (4°C, 2 W, unbegrenzte V und mA), wobei sich der pH-Gradient etabliert. Die Fokussierung erfolgt dann bei 8 Watt (4°C, unbegrenzte V und mA) über Nacht. Am Folgetag werden die Banden dann mit einem schmalen Spatel aus der Gelmasse herausgehoben. Das Ultrodex wird über eine 10 ml BioRAD-Säule mit Fritte abfiltriert.

2.3.18. Import von Proteinen in isolierte, intakte Chloroplasten

Für den Import von Proteinen in Chloroplasten werden zum einen aufgereinigte und intakte Chloroplasten benötigt, zum anderen Blattextrakt, der für den Import wichtige Substanzen und Kofaktoren enthält.

2.3.18.1. Isolation von Blattextrakt

Für die Isolation von Blattextrakt aus Erbsenpflanzen wird $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ Schale (40 x 60 cm) Erbsen (*Pisum sativum* var. *Golf*) auf Vermikulit ausgesät (zu Anzuchtbedingungen vgl. 2.3.4.1). Bei der Ernte sollten die Pflanzen nicht älter als 7-9 Tage sein. Das oberste Drittel der Pflanzen wird mit einer Schere zerkleinert und mit 10-15 ml kaltem Puffer (50 mM HEPES-KOH pH 7,6, frisch 0,5 mM PMSF) gepottert. Anschließend wird das Material für 30 Minuten bei ca. 200000 * g (38000 rpm, Rotor SW60Ti) und 4°C in der Ultrazentrifuge pelletiert. Der Überstand wird abgenommen und nach Proteinbestimmung (BCA-Methode, vgl. 2.3.2.2) aliquotiert, schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.3.18.2. Isolation der Chloroplasten

Die Isolation funktionsfähiger Chloroplasten sollte kalt und nicht bei direkter Sonneneinstrahlung erfolgen. Hierzu wird von 1-2 Schalen 7-9 Tage alter Erbsenpflanzen das obere Drittel abgeschnitten und mit einer Schere grob zerkleinert. Anschließend wird das Blattmaterial in kaltem Isolationsmedium im Waring Blendor homogenisiert. Das Homogenat wird dann durch 4 Lagen Baumwollgaze und 1 Lage Nylongaze filtriert und der Durchfluss 1 Minute bei 1000 * g und 4°C abzentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge, Rotor JLA10500). Die nun pelletierten Chloroplasten werden mit einem weichen Pinsel in 5-10 ml Isolationsmedium resuspendiert und die Plastidensuspension auf vorbereitete Percollgradienten geschichtet (40 bzw. 80% Percoll). Der Gradient wird 15 Minuten bei ca. 4000 x g (5100 rpm, Ausschwingrotor JS13.11, Beckman Kühlzentrifuge) und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befinden sich die intakten Chloroplasten an der Trennschicht zwischen 40 und 80% Percoll, der Chloroplastenbruch liegt der 40%-igen Schicht auf. Die intakten Chloroplasten werden nun mit einer Pipette und gekühlten, abgeschnittenen Spitzen vorsichtig abgesaugt. Die Percoll-Lösung wird entfernt, indem die Chloroplasten 1:4 mit Waschmedium verdünnt und pelletiert werden (1 min, 1000 * g, 4°C, Beckman Kühlzentrifuge, Rotor JS13.11). Im Folgenden werden die Chloroplasten abermals mit einem weichen Pinsel in 0,5-1 ml Waschmedium resuspendiert. Die aufgereinigten Chloroplasten werden nun nach photometrischer Chlorophyllbestimmung (vgl. 2.3.4) mit Importpuffer auf 1 mg/ml Chlorophyll eingestellt.

Isolationsmedium: 330 mM Sorbit, 50 mM HEPES-KOH pH 8,0, 1,5 mM MgCl₂

Percoll: 40 bzw. 80% Percoll [v/v] in 330 mM Sorbit, 50 mM HEPES-KOH pH 8,0, 1 mM EDTA; für die Gradienten werden 15 ml 40%-iges mit 10 ml 80%-igem Percoll unterschichtet.

Waschmedium: 330 mM Sorbit, 50 mM HEPES-KOH pH 8,0

Importpuffer: 330 mM Sorbit, 50 mM HEPES-KOH pH 7,6, 3 mM MgCl₂

2.3.18.3. Vorbereiten der Proteine und Dialyse

2 µg Protein in Inclusion bodies werden kurz anzentrifugiert und das Pellet dann in 2 µl 8 M Harnstoff, 8 mM DTT gelöst. Nach 5-minütiger Zentrifugation (18500 x g = 12 000 rpm, RT, Hettich Tischzentrifuge) wird der Überstand, der das Protein denaturiert in gelöster Form enthält, zu 780 µg Blattextrakt gegeben. Um nun den Harnstoff zu entfernen, dialysiert man den Blattextrakt 30 Minuten auf einer Dialysemembran (Millipore) mit 25 nm Porengröße bei 4°C gegen Importpuffer (+ 1 mM DTT).

2.3.18.4. Importreaktion

Ein 100 µl Reaktionsansatz für den Import setzt sich wie folgt zusammen:

20 µl Chloroplasten (1 mg/ml)

50 µl Dialyseansatz

30 µl Importpuffer mit 10 mM NaHCO₃, 2 mM ATP, 3 mM MgCl₂, 20 mM K-Gluconat, 2% BSA [w/v]

Der Import-Ansatz wird 30 Minuten bei 25°C im Schüttelwasserbad inkubiert und dabei mit Zusatzlicht von ca. 50-60 µmol * e⁻ * m⁻² * s⁻¹ bestrahlt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 500 µl Importpuffer gestoppt, anschließend wird 3 Minuten bei 1000 x g und RT (Tischzentrifuge) zentrifugiert.

2.3.18.5. Proteasebehandlung der Chloroplasten

Nach dem Import unterzieht man die Chloroplasten einer Proteasebehandlung, deren Ziel es ist, nicht importiertes Protein an der Chloroplastenmembran oder im Medium abzdauen. Der Erfolg des Importes wird dann anschließend nach Lyse der Plastiden mittels Western-Blot getestet. An dieser Stelle ist es wichtig, die Chloroplasten in 2 Fraktionen aufzuteilen, von denen eine als Kontrolle dient und nicht verdaut wird.

Zur Proteasebehandlung wird das Pellet in 450 µl Puffer C aufgenommen und mit 50 µl Thermolysin (2 mg/ml in Puffer C) versetzt. Der Ansatz wird für 40 Minuten auf Eis inkubiert, danach die Reaktion mit 5 mM EDTA abgestoppt. Zur Aufreinigung der noch intakten Chloroplasten wird nun nochmals ein Reinigungsschritt über Percoll (40% [v/v] in Importpuffer, 5 mM EDTA) angeschlossen. Nach Zentrifugation (5 min, 3000 * g, 4°C, Hettich Kühlzentrifuge) befindet sich der Chloroplastenbruch oben auf dem Percollkissen, die intakten Chloroplasten können mit abgeschnittener Spitze vom Boden abgesaugt werden. Sie werden mit 1 ml Importpuffer, 5 mM EDTA gewaschen und abermals pelletiert (2 min, 1000 * g, RT).

Puffer C: 0,5 mM CaCl₂ in Importpuffer

2.3.18.6. Lyse der Chloroplasten

An dieser Stelle kann gegebenenfalls getestet werden, ob das in die Chloroplasten importierte Protein auch in die Thylakoidmembran inseriert worden ist. Dazu wird das Chloroplastenpellet aufgeteilt. Chloroplasten, deren Thylakoide nicht weiterverwendet werden, werden in 500 µl Lysispuffer A aufgenommen, 10 Minuten auf Eis inkubiert und die Thylakoide 5 Minuten bei 25000 * g und 4°C pelletiert. Der Überstand enthält das von den Thylakoiden abgetrennte Stroma.

Chloroplasten, deren Thylakoide weiterverwendet werden, werden in 500 µl Lysispuffer B aufgenommen, 10 Minuten auf Eis lysiert und 5 Minuten bei 8000 x g und 4°C zentrifugiert. Die pelletierte Thylakoidfraktion wird anschließend in 500 µl 10-0,5 HC-Puffer resuspendiert und mit 0,2 mg/ml Thermolysin versetzt. Die Proteasebehandlung erfolgt 40 Minuten auf Eis, die Reaktion wird durch Zugabe von 10 mM EDTA und 500 µl 10-5 HE-Puffer abgestoppt. Nach Zentrifugation (5 min, 25000 * g, 4°C) wird das Pellet einer Acetonfällung unterzogen um bei den folgenden Analysen störendes Pigment zu entfernen. Das Pellet wird also in 80 µl HE-Puffer resuspendiert, die Acetonkonzentration wird durch Zugabe von 320 µl 100% Aceton auf 80% eingestellt und der Ansatz mindestens eine Stunde bei -20°C inkubiert. Abschließend erfolgt eine Zentrifugation (15 min, 25000 * g, 4°C).

Der Import kann über eine SDS-PAGE und anschließenden Western-Blot nachgewiesen werden. Dazu werden alle mit Protease behandelten und nicht verdauten Stroma- und Thylakoidfraktionen verwendet.

<u>Lysispuffer A:</u>	10 mM HEPES-KOH pH 7,6, 5 mM EDTA
<u>Lysispuffer B:</u>	10 mM HEPES-KOH pH 8,0, 0,5 mM CaCl ₂
<u>10-0,5 HC-Puffer:</u>	10 mM HEPES-KOH pH 8,0, 0,5 mM CaCl ₂
<u>10-5 HE-Puffer:</u>	10 mM HEPES-KOH pH 8,0, 5 mM EDTA

2.3.19. Isolation intakter Chloroplasten aus Blättern von *Arabidopsis thaliana*

Für die Versuche zum Import von Proteinen in intakte Chloroplasten wurden in dieser Arbeit die Organellen aus der Erbse und aus *Arabidopsis thaliana* isoliert. Im Gegensatz zu Erbsenblättern sind Blätter und Chloroplasten der Ackerschmalwand sehr instabil und die Chloroplasten würden daher eine Isolation, wie sie aus der Erbse gemacht wird, nicht überstehen. Daher ist es notwendig, sich eines Umwegs zu bedienen (Somerville *et al.*, 1980), indem man zunächst intakte *Arabidopsis*-Protoplasten isoliert.

2.3.19.1. Anzucht von *A. thaliana*

Samen von *A. thaliana* var. *Columbia* wurden auf zuvor autoklavierter Gartenerde im Abstand von ca. 5 cm ausgesät. Die Samen wurden zunächst für 2 Tage im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt um ein gleichzeitiges Keimen zu erreichen. Da es für die Versuche wichtig war, möglichst viel Blattmaterial zu erhalten, wurden die Pflanzen erst für einige Wochen unter Kurztagsbedingungen (8:16 h Licht-Dunkel-Rhythmus) bei 18°C angezogen und später in 22°C und einen 16:8 h Licht-Dunkel-Rhythmus überführt.

2.3.19.2. Isolation intakter Protoplasten

Von ca. 2 Monate alten Blättern wurde unter einem Binokular mit einer feinen Pinzette die untere Epidermis entfernt. Dieser Schritt dient dazu, die Protoplasten für Enzyme zugänglich zu machen. Es werden mindestens 15-20 Blätter benötigt. Die Blätter wurden mit der Unterseite in eine mit 15 ml Puffer 1 gefüllte große Petrischale gelegt (auf Eis) und 1-1,5 Stunden inkubiert. Dabei ist zu beachten, dass ein längerer Verdau zwar vollständiger ist, aber eine geringere Ausbeute an intakten Chloroplasten nach sich zieht. Durch die Enzyme Macerase und Cellulysin werden die Protoplasten aus dem Zellverband herausgelöst und sammeln sich am Boden der Petrischale. Oben auf dem Puffer schwimmt nach dem Verdau nur noch die obere Epidermis des Blattes. Die Protoplasten werden nun 4 Minuten bei 100 x g und 4°C pelletiert und anschließend in kaltem Puffer 2 resuspendiert.

Puffer 1: 0,5 M Sorbitol, 10 mM Mes pH 5,5, 1 mM CaCl₂, 1,6% Macerase, 1,6% Cellulysin.

Puffer 2: 0,5 M Sorbitol, 10 mM Mes pH 6,0, 1 mM CaCl₂

2.3.19.3 Chloroplasten-Isolation aus intakten Protoplasten

Die Protoplasten werden nochmals wie zuvor pelletiert. Ein Teil wird für eine photometrische Chlorophyllbestimmung verwendet (vgl. 2.3.4) und die Protoplasten werden mit kaltem Import-Puffer A auf 80-100 µg Chlorophyll/ml eingestellt. Die Ruptur der Protoplasten wird durch langsames Pipetieren der Protoplastensuspension durch eine mit Nylongaze (Durchmesser 15 µm) bespannte, abgeschnittene 5 ml-Spitze gewährleistet. Anschließend werden die Chloroplasten pelletiert (~270 x g, 4°C, 2 min) und können nun in die Importreaktion eingesetzt werden (vgl. 2.3.18).

Import-Puffer A: 0,3 M Sorbitol, 20 mM Tricine pH 8,4, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 10 mM NaHCO₃, 0,1% [w/v] BSA

2.3.20. Insertion von Proteinen in Erbsenthylakoide

Wie auch für den Import von Proteinen werden für die Insertion zunächst intakte Chloroplasten isoliert, um möglichst unbeschadete Thylakoide sowie auch das Stroma zu erhalten.

2.3.20.1. Isolation der Thylakoide aus intakten Chloroplasten

1-2 Schalen Erbsenpflanzen werden 7-9 Tage wie oben beschrieben angezogen (vgl. 2.2.4). Bei der Ernte wurde das obere Drittel der Pflanzen mit einer Schere grob zerkleinert und in kaltem

Isolationsmedium im Waring Blendor homogenisiert. Das Homogenat wird dann durch 2 Lagen Baumwollgaze und 1 Lage Nylongaze (Porengröße 30µm) filtriert und der Durchfluss 1 Minute bei 3800 * g und 4°C abzentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge, Rotor JLA10500). Die nun pelletierten Chloroplasten werden mit einem weichen Pinsel in 10-15 ml Isolationsmedium resuspendiert und die Plastidensuspension auf vorbereitete Percollgradienten geschichtet (15 ml 40%-iges mit 10 ml 80%-igem Percoll unterschichten). Der Gradient wird 15 Minuten bei ca. 4079 x g (5100 rpm, Ausschwingrotor JS13.11, Beckman Kühlzentrifuge) und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befinden sich die intakten Chloroplasten an der Trennschicht zwischen 40 und 80% Percoll, der Chloroplastenbruch liegt der 40%-igen Schicht auf und wird verworfen. Die intakten Chloroplasten werden nun mit einer Pipette und gekühlten, abgeschnittenen Spitzen vorsichtig abgesaugt. Die Percoll-Lösung wird entfernt, indem die Chloroplasten 1:4 mit Insertionspuffer verdünnt und pelletiert werden (1 min, 2200 * g (4000 rpm), 4°C, Beckman Kühlzentrifuge, Rotor JS13.11). Der Überstand wird verworfen, der Rand des Röhrchens wird mit einem Papiertuch trockengewischt. Die pelletierten Chloroplasten werden in wenig (0,5–1 ml) Insertionspuffer aufgenommen und nach photometrischer Chlorophyllbestimmung (vgl. 2.3.5) mit Insertionspuffer auf 3 mg/ml Chlorophyll eingestellt.

<u>Isolationsmedium:</u>	330 mM Sorbit, 50 mM HEPES-KOH pH 8,0, 1,5 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O
<u>Percoll:</u>	40 bzw. 80% Percoll [v/v] in 330 mM Sorbit, 50 mM HEPES-KOH pH 8,0, 1 mM EDTA
<u>Insertionspuffer:</u>	330 mM Sorbit, 50 mM HEPES-KOH pH 7,6

2.3.20.2. Isolation von Stromaprotein und Thylakoiden

Die eingestellte Chloroplastensuspension wird 3 Minuten bei 2600 * g und 4°C zentrifugiert. Das Volumen des Überstandes wird bestimmt und die Lyse der Chloroplasten erfolgt nach vorsichtigem Mischen in demselben Volumen Lysispuffer für 10 Minuten auf Eis. Die Thylakoide werden pelletiert (10 min, 8000 * g, 4°C), das Stroma abgehoben und einer Proteinbestimmung unterzogen (BCA-Assay, vgl. 2.3.3.2). Das Thylakoidpellet wird in Insertionspuffer aufgenommen und damit auf 2 mg Chlorophyll/ml eingestellt.

2.3.20.3. Vorbereiten der Proteine und Insertionsreaktion

2 µg Protein in Inclusion bodies werden kurz anzentrifugiert und das Pellet dann in 2 µl 8 M Harnstoff, 8 mM DTT gelöst. Direkt vor der Insertionsprozedur wird ungelöstes Protein durch Zentrifugation entfernt (18500 * g = 12 000 rpm, RT, Hettich Tischzentrifuge) und der Überstand wird dann in die Insertionsreaktion eingesetzt.

Für die Insertionsreaktion werden Thylakoide, Stroma, Protein, ATP und Insertionspuffer so gemischt, dass sich folgende Endkonzentrationen ergeben: 1,16 mM DTT, 10 mM ATP, 5-15 mM

Mg^{2+} , 102 mM Sorbitol, 26 mM HEPES-KOH pH 8, mind. 450 μ g Stromaprotein, 32-200 nM Protein (für das OHP wurden i.d.R. 100 nM (1,1 μ g) eingesetzt). Die Reaktion findet für 30 Minuten bei 25°C und ca. 50 μ mol * e⁻¹ * m² * s⁻¹ Zusatzlicht im Schüttelwasserbad statt, sie wird durch Zugabe von 200 μ l Puffer X abgestoppt. Es folgt ein Zentrifugationsschritt (5 min, 8000 x g (10000 rpm), 4°C, Eppendorf Tischzentrifuge).

2.3.20.4. Proteaseverdau und Fällung der Proteine

Das Thylakoidpellet eines 100 μ l Insertionsansatzes wird in 100 μ l 10-0,5 HC-Puffer (vgl. 2.3.18.6) aufgenommen und mit 50 μ l Thermolysin (1 mg/ml in HC-Puffer) versetzt. Nach Zugabe von weiteren 350 μ l des HC-Puffers erfolgt der Verdau für 25 Minuten bei 25°C im Schüttelwasserbad. Durch Zugabe von 10 mM EDTA und 500 μ l 10-5 HE-Puffer wird die Reaktion abgestoppt.

Vor der Analyse der importierten Proteine mittels SDS-PAGE und Western-Blot werden die Proteine gefällt, um störende Pigmente und Membranlipide zu entfernen. Dazu wird der Ansatz 5 Minuten bei 4°C und 8000 rpm in der Eppendorf Tischzentrifuge pelletiert. Je 34 μ g Chlorophyll werden nun 80 μ l HE-Puffer und 320 μ l 100% Aceton (Endkonzentration 80%) hinzugegeben. Die Fällung erfolgt mindestens 1 Stunde bei -20°C. Nach 15-minütiger Zentrifugation mit 4°C und maximaler Geschwindigkeit in der Eppendorf Tischzentrifuge wird der Überstand verworfen, das Pellet evtl. einmal mit 80%-igem Aceton nachgewaschen und in 1 x Sparmix aufgenommen. Die Analyse erfolgt über SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot mit OHP-spezifischem Antikörper.

2.3.21. Western-Blot

Der Western- oder auch Immunoblot erlaubt den Nachweis von immobilisierten Proteinen über einen spezifischen Antikörper. Dieser ist entweder direkt oder über einen sekundären Antikörper an ein Enzym gekoppelt, das in Gegenwart eines geeigneten Substrates eine Farb- oder Chemilumineszenzreaktion hervorruft.

Das Protein oder Proteingemisch wird zunächst über eine SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend in einem Tankblotsystem auf eine in Blotpuffer angefeuchtete Nitrocellulosemembran transferiert. Der Blotaufbau setzt sich wie folgt zusammen: zwischen ein Plastikgitter werden der Reihe nach ein Schaumstoffstück, ein Whatman Papier, das PAA-Gel, die gleich große Nitrocellulosemembran, erneut ein Whatman Papier und wieder eine Lage Schaumstoff gelegt. Das Blot-

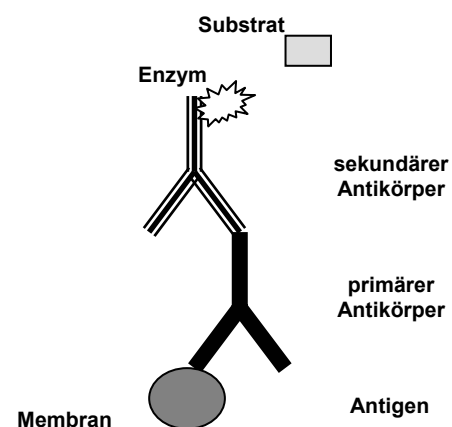


Abb. 2.6.: Western-Blot, schematisch

„Sandwich“ wird mit der zweiten Gitterseite verschlossen und so in die Blotkammer eingesetzt, dass die durch das SDS negativ geladenen Proteine in Richtung der positiv geladenen Anode aus dem Gel auf die Membran transferiert werden können. Der Transfer erfolgt bei 4°C für 90 Minuten bei 196 mA oder ü.N. bei 11 mA.

Nach dem Transfer kann dieser durch eine Färbung der Membran mit Ponceau S (Salinovich, 1986) überprüft werden. Dazu wird die Membran für ca. 10 Minuten auf dem Schüttler in der Ponceau S Lösung inkubiert. Anschließend wird überschüssige Farbe vorsichtig mit H₂O *dest.* entfernt und alle transferierten Proteinbanden erscheinen rot gefärbt. Um die Färbung vollständig zu entfernen wird die Membran bis zum Verschwinden der Banden mit H₂O *dest.* gewaschen.

Vor der Zugabe des Antikörpers wird die Membran nun blockiert, das bedeutet die Absättigung aller nicht durch Proteine besetzten Antikörperbindestellen auf der Membran. Dies wird durch Proteine gewährleistet, beispielsweise BSA, die nicht an der Antikörperreaktion teilnehmen. Die Membran wird dazu in Blockingpuffer entweder für mindestens eine Stunde bei RT auf dem Schüttler oder ü.N. bei 4°C inkubiert. Nach dem Blockieren wird der primäre Antikörper auf die Membran gebracht, indem er in 5 ml TBST entsprechend verdünnt (s.u.) und mit der Membran zwischen Plastikfolie eingeschweißt für eine Stunde inkubiert wird (RT, Schüttler). Der Antikörper wird durch 3 Waschschrte (5 min, RT, Schüttler) mit je ca. 20 ml TBST entfernt. Nun wird die Membran in gleicher Weise mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Dieser ist an das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt, das die Substrate BCIP und NBT zu einem violetten Niederschlag umsetzt. Nach den 3 Waschschrten (s.o.) folgt eine 5-minütige Inkubation mit ca. 20 ml AP-Puffer. Anschließend folgt die Färbereaktion mit BCIP und NBT. Auch hierzu wird die Membran eingeschweißt und zusammen mit 5 ml AP-Puffer, 33 µl NBT und 16,5 µl BCIP im Dunklen bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Die Färbereaktion dauert ca. 15 Minuten. Dabei spaltet die Alkalische Phosphatase die Phosphatgruppe des BCIP ab. Das wird oxidiert und bildet einen violetten Niederschlag. Dieser wird durch die Kombination mit NBT verstärkt, das reduziert wird und ebenfalls eine violette Färbung verursacht. Die Reaktion kann gestoppt werden, indem der Blot vorsichtig mit H₂O *dest.* angespült wird.

Nitrocellulosemembran: Optitran Ba-S 83 Reinforced Cellulose Nitrate Membrane 0,2 µm, Schleicher & Schuell

Blotpuffer: 20 mM Tris, 150 mM Glycin, 10% [v/v] Methanol

Ponceau S: 0,2% [w/v] in 3% [v/v] Trichloressigsäure (TCA)

Blockingpuffer: 3% [w/v] BSA in 1 x TBS

10 x TBS: 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl

5 x TBST: 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl, 0,25% [v/v] Tween 20

Antikörper: primäre Antikörper: α-OHP (aus Kaninchen, von Stefan Jansson, Umeå, Schweden), 1:2000 in ½ Blockingpuffer
α-His₅ (aus der Maus, von Quiagen, Hilden), 1:2000 in ½ Blockingpuffer

α -ScpC/D (aus Kaninchen, von Christiane Funk, Stockholm, Schweden), 1:1000 in Blockingpuffer

sekundäre Antikörper: α -Maus, Alcaline Phosphatase (AP)-Conjugate

hergestellt in der Ratte (Sigma), 1: 25 000 in 1 x TBST

α -Kaninchen, AP-Conjugate hergestellt in der Ziege (Sigma), 1: 5 000 in 1 x TBST

AP-Puffer: 100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂

BCIP: 5% [w/v] 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat in H₂O *dest.*

NBT: 5% Nitroblautetrazoliumchlorid in 70% Dimethylformamid (DMF)

2.4. Spektroskopische Methoden

2.4.1. Absorptions-Spektroskopie

Grundlagen

Licht oder elektromagnetische Strahlung kann als eine oszillierende, transversale Welle beschrieben werden (Galla, 1988). Es setzt sich aus den oszillierenden Vektoren des elektrischen und des magnetischen Feldes zusammen, die senkrecht aufeinander stehen. Für die Absorptions-Spektroskopie ist der elektrische Feldvektor von größerem Interesse. Bei der Absorption von Licht nehmen die Elektronen eines Farbstoffmoleküls Energie auf und gehen in einen angeregten Zustand über. So ändert sich die Ladungsverteilung des absorbierenden Moleküls und man erhält ein verändertes Dipolmoment. Die Differenz zwischen dem Grundzustand und dem angeregten Zustand wird als Übergangsdipolmoment bezeichnet. Die Orientierung dessen bezeichnet nun die Polarisationssebene der Absorption. Die Wahrscheinlichkeit der Absorption bei einer Wellenlänge λ wird durch den molaren Extinktionskoeffizienten charakterisiert. Die Extinktion kann durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beschrieben werden:

$$E = \varepsilon * c * d$$

wobei ε der Extinktionskoeffizient, c die Konzentration und d die Schichtdicke der Küvette darstellt.

Messparameter

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle in dieser Arbeit gezeigten Absorptionsspektren bei Raumtemperatur (RT) aufgenommen.

Die Absorptionsspektren bei **RT** wurden mit folgenden Einstellungen gemessen:

Detektionsmodus: Absorption

<u>Wellenlängenbereich:</u>	350–750 nm
<u>Messgeschwindigkeit:</u>	medium–fast
<u>Spaltbreite:</u>	0,5–1 nm
<u>Increment:</u>	1 nm

Vorbereitung der Proben für 77K Absorption:

Die Proben werden in einer Halbmicro-Plastikküvette mit 80%-igem Glycerin (gepuffert mit 40 mM HEPES pH 7,5) auf eine Endkonzentration von 60% eingestellt. Beide Lösungen werden durch mehrmaliges vorsichtiges Umkehren der mit Parafilm verschlossenen Küvette gemischt. Die Probe wird anschließend für ca. 5 Minuten bei RT inkubiert, um störende Luftblasen zu vermeiden. Mit der Aufnahme von Tieftemperatur-Absorptionsspektren kann man wegen Abwesenheit von Rotation innerhalb der Übergänge einerseits eine Verschmälerung der Absorptionsbanden erreichen, aber auch verschiedene in einem Protein-Pigment-Komplex befindliche Absorptionsformen eines Pigmentes identifizieren. Hierzu wird die 2. oder 4. Ableitung des Spektrums verwendet.

Die Absorptionsspektren bei **77K** wurden mit folgenden Einstellungen aufgenommen:

<u>Detektionsmodus:</u>	Absorption
<u>Wellenlängenbereich:</u>	600–750 nm
<u>Messgeschwindigkeit:</u>	medium
<u>Spaltbreite:</u>	0,5–1 nm
<u>Increment:</u>	1 nm

2.4.2. CD-Spektroskopie

Grundlagen

Die CD-Spektroskopie ist eine spezielle Form der Absorptionsspektroskopie und damit abhängig von der Anwesenheit von Chromophoren. Als Chromophor wird ein Molekül oder eine kovalent gebundene, nicht gesättigte Gruppe bezeichnet, die für das elektronische Absorptionsspektrum verantwortlich ist (Schmidt, 2000).

Polarisiertes Licht

Eine natürliche Lichtquelle entsendet unpolarisiertes Licht, d.h. elektrische und magnetische Feldvektoren sind isotrop verteilt. Bei linear polarisiertem Licht schwingt der elektrische Feldvektor E nur in einer Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung, mit periodischer Vergrößerung und Verkleinerung der Amplitude. Linear polarisiertes Licht ist aus zwei zirkular polarisierten Komponenten zusammengesetzt (Abb. 2.7). Durch Vektoraddition ergibt sich aus beiden Komponenten wieder der Feldvektor des linear polarisierten Lichtstrahls (A). Bei zirkular polarisiertem Licht beschreibt der elektrische Feldvektor eine Helix um die Achse der Ausbreitungsrichtung, die Amplitude bleibt jedoch gleich. CD-Signale werden in der Einheit Elliptizität θ (in Grad) gemessen.

Elliptizität bedeutet das Verhältnis der kurzen zur langen Ellipsenachse in einem Vektor, der aus Addition der Feldvektoren mit verschieden großen Amplituden entsteht und daher eine Ellipse beschreibt (Abb. 2.7.B).

Entstehung von CD-Signalen

Manche Moleküle haben die Eigenschaft, rechts- und linkszirkular polarisiertes Licht in unterschiedlichem Maß zu absorbieren. Bei der Absorption von Lichtenergie wird ein Elektron in ein höheres Orbital angehoben. Bei diesem elektronischen Übergang entsteht eine Ladungs-

verschiebung mit einem veränderten Dipolmoment. Wenn diese Ladungsverschiebung asymmetrisch ist, treten unterschiedliche Absorptionskoeffizienten für links- bzw. rechtszirkular polarisiertes Licht auf. Bei abwechselnder Bestrahlung einer Probe mit beiden Lichtarten wird die Differenz in den Absorptionen von linkszirkular bzw. rechtszirkular polarisiertem Licht gemessen und letztendlich als CD-Spektrum ausgedrückt.

Wenn zirkular polarisiertes Licht von Molekülen absorbiert wird, hat man es entweder mit einer intrinsischen, d.h. durch den Chromophor selbst bedingten, Ladungsverschiebung zu tun oder mit einer excitonischen Kopplung, also gegenseitiger Beeinflussung der Übergangsdipole von Chromophoren (Schmidt, 2000). Excitonische Interaktionen von mehreren Chromophoren innerhalb eines Komplexes führen zu einer Veränderung der Absorptionseigenschaften. Es kann nun zu einer Aufspaltung der Absorptionsbande in zwei unterschiedliche Banden kommen, denn je nach Stärke der Absorption verursacht die Differenz zwischen den Absorptionen von links- und rechtszirkular polarisiertem Licht ein positives oder ein negatives Signal. Der Nulldurchgang zwischen den Signalen liegt an der Wellenlänge der ursprünglichen Absorption. Diese Bandenform nennt man konservativ, sie entsteht bei der Kopplung von gleichartigen Chromophoren oder von Chromophoren, deren Absorptionsbanden nur wenig voneinander entfernt liegen. In Protein-Pigment Komplexen können neben den Pigmenten auch die Amid-Gruppen der Proteine für die Entstehung von CD-Signalen verantwortlich sein. Freie Chlorophylle in Lösung haben nur ein sehr schwaches intrinsisches CD-Signal, das CD-Signal von Proteinen oder Pigment-Protein Komplexen dagegen beruht auf excitonischer Kopplung der Chromophore untereinander und resultiert in der oben beschriebenen konservativen Bandenform.

Die CD-Signale entstehen also durch die Orientierung und den Abstand der Chromophore zueinander, der für die excitonische Kopplung gegeben sein muss. CD-Spektren im

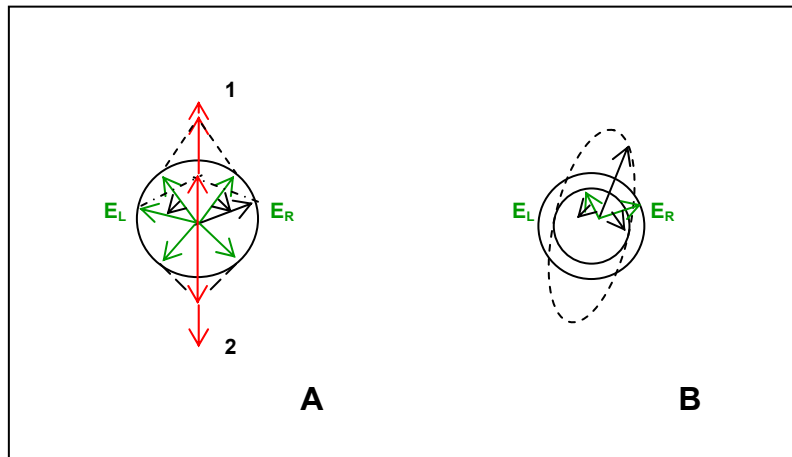


Abb. 2.7.: A) Zeigerdiagramm der Kombination von rechts- und links polarisiertem Licht zu einer linear polarisierten Welle. Deren Amplitude schwingt zwischen den Positionen 1 und 2. B) Entstehung elliptisch polarisierten Lichtes aus zwei zirkular polarisierten Wellen unterschiedlicher Amplituden. E , elektrischer Feldvektor. Modifiziert nach Galla, 1988.

Absorptionsbereich der am Komplex beteiligten Pigmente können Hinweise auf die räumliche Orientierung der Pigmente zueinander und Interaktionen untereinander liefern.

Messparameter

Die CD-Spektren wurden bei 4°C mit folgenden Einstellungen aufgenommen:

<u>Wellenlängenbereich:</u>	190–250 nm (UV) bzw. 350–750 nm (VIS)
<u>Scan Speed:</u>	50 nm/min
<u>Sensitivity:</u>	100 mdeg
<u>Data Pitch:</u>	0,5 nm
<u>Band Width:</u>	4 nm
<u>Response Time:</u>	4 sec

2.4.3. Fluoreszenz-Spektroskopie

Grundlagen

Fluoreszenz findet meist bei aromatischen und heterozyklischen Molekülen statt. Diese werden dann als Fluorophore bezeichnet. Sie befinden sich bei Raumtemperatur im niedrigsten Schwingungsniveau des elektronischen Grundzustands S_0 . Die Absorption eines Lichtquants überführt das Molekül nun in den ersten angeregten (S_1) oder einen höheren Singulettzustand (S_2 , S_3) (Galla, 1988).

Fluoreszenzemission tritt nun beim Übergang vom niedrigsten Schwingungsniveau des ersten angeregten Singulettzustands (S_1) in ein normalerweise höheres Schwingungsniveau des Singulettgrundzustandes S_0 auf. Daher ist die energiehöchste Fluoreszenzbande gegenüber der energieniedrigsten Absorptionsbande normalerweise längerwellig verschoben (Stokes shift). Als Fluoreszenzemissionsspektrum bezeichnet man die Messung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Emissionswellenlänge bei fester Anregungswellenlänge. Ein Excitationspektrum dagegen beschreibt die Fluoreszenzintensität der Probe bei konstanter Emissionswellenlänge in Abhängigkeit von veränderter Anregungswellenlänge.

Messparameter

Fluoreszenzemissions- und Excitationsspektren wurden bei RT mit folgenden Einstellungen aufgenommen:

<u>Integrationszeit:</u>	0,1 sec
<u>Increment:</u>	0,1 nm
<u>Spaltbreite:</u>	Ex.: 3 nm; Em.; 3 nm
<u>Lamp Level:</u>	2
<u>Korrektur des Lampenspektrums</u>	mit (S/R)

3. Ergebnisse

3.1. Versuche zur Rekonstitution und Charakterisierung des WSCP

Die Funktion des WSCP ist bislang noch völlig unklar. Um Informationen darüber zu erhalten, sollten biochemische Eigenschaften sowohl des nativen als auch des rekombinanten Proteins ermittelt werden. Für die Arbeit am rekombinanten WSCP wurde uns von Hiroyuki Satoh ein Klon zur Verfügung gestellt, der für ein Fusionsprotein codiert. Dieses Fusionsprotein besteht aus dem WSCP-Teil und dem N-terminal angehängten maltosebindenden Protein MBP, dem Maltose-Transporter von *Escherichia coli*. Zunächst sollten Rekonstitutionsexperimente mit dem Fusionsprotein durchgeführt werden. Um das rekonstituierte WSCP mit dem nativen Protein vergleichen zu können, wurde dieses aus Blumenkohlblättern isoliert.

3.1.1. Aufreinigung des nativen WSCP aus Blumenkohlblättern

Die Präparation des nativen WSCP sollte aus Blättern von 8 Wochen alten Blumenkohlpflanzen erfolgen (Satoh *et al.*, 1998, vgl. 2.3.2). Es stellte sich jedoch heraus, dass mit alten, voll ausgebildeten Blättern (vom Markt) bessere Ergebnisse erzielt werden konnten (nicht gezeigt). Nach erfolgreicher Isolierung und Aufreinigung sollten das native WSCP und das rekonstituierte rekombinante WSCP vergleichend betrachtet werden. Zunächst wurden Versuche zur Rekonstitution des MBP-WSCP-Fusionsproteins durchgeführt.

3.1.2. Rekonstitutionsversuche mit dem MBP-WSCP-Fusionsprotein

Nach erfolgreicher Überexpression und Aufreinigung des MBP-WSCPs über eine Amylose-Resin Säule (vgl. 2.3.1.3, nicht gezeigt) wurden Rekonstitutionsversuche nach Satoh *et al.* (1998) sowohl mit isolierten Thylakoidmembranen als auch mit aufgereinigten Chlorophyllen durchgeführt. Es konnte eine Pigmentbindung an das Fusionsprotein bestätigt werden (nicht gezeigt). Um mehr über die Funktion des WSCP zu erfahren, sollten spektroskopische Untersuchungen sowie Pigment-Protein-Stöchiometrien durchgeführt werden. Um eventuelle Störungen durch den MBP-Teil auszuschließen, wurde dieser zunächst durch Umklonierung aus dem Fusionsprotein entfernt.

3.1.3. Konstruktion und Überexpression von WSCP-his

Das MBP-WSCP Fusionsprotein in dem Vektor pMAL-cRI diente als Ausgangsprodukt für eine Umklonierung in einen pDS-Vektor mit gleichzeitigem Einfügen eines N-terminalen Hexahistidylrestes. Das 209 Aminosäuren lange mature WSCP weist einen hydrophoben Bereich von 14 Aminosäuren auf, der außerdem einen Sequenzbereich enthält, der zu der [F/Y]DPLGL Sequenz, einem konservierten Bereich der Cab-Proteine, homolog ist. Das ca. 22 kD große Protein hat eine positive Nettoladung und einen Isoelektrischen Punkt von ca. 8,5. Das 228 Aminosäuren lange WSCP-Vorläuferprotein enthält eine Signalsequenz für den Eintritt in den sekretorischen Weg, die Spaltstelle folgt zusätzlich noch der „-1, -3“ Regel für sekretorische Proteine (Sato *et al.*, 2001, von Heijne 1983).

Der für das mature WSCP codierende Bereich wurde mit den Restriktionsendonucleasen EcoRI und HindIII aus dem Klon MBP-WSCP herausgeschnitten (vgl. 2.2.7). Ein synthetisches Oligonucleotid wurde zum Einfügen des Hexahistidylrestes benutzt. Es war so gewählt worden, dass es sich 5'-terminal vor dem Beginn der WSCP-Sequenz anfügen ließ. Der Vektor wurde durch Restriktion des für das LHCP codierenden Klons (D7f.3) mit SphI und HindIII erhalten und anschließend wurden Vektor wie auch WSCP-Insert auf vollständigen Verdau überprüft (nicht gezeigt) und aufgereinigt. Vektor, Oligonucleotid und Insert wurden ligiert und kompetente *E. coli*-Zellen mit dem neuen Klon WSCP-his transformiert (zu den Zwischenschritten vgl. 2.2.8-14).

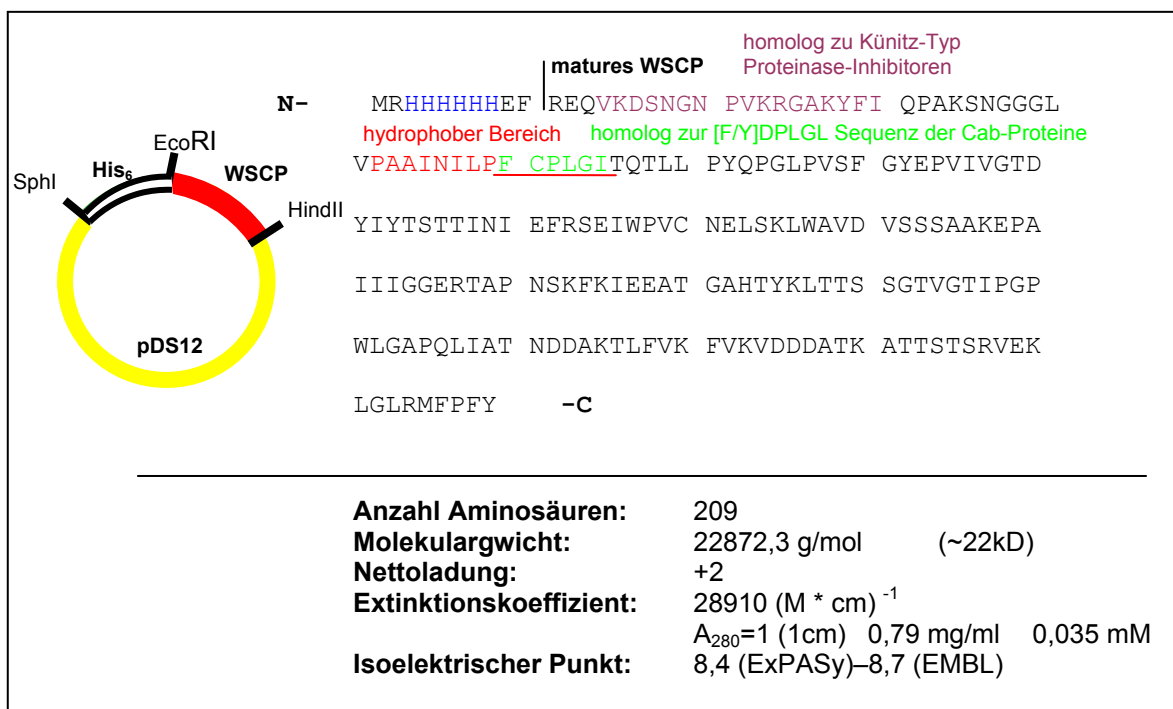


Abb. 3.1: Skizze sowie Aminosäuresequenz und Eigenschaften des umklonierten WSCP-his Proteins. Die Eigenschaften beziehen sich auf das ungefaltete WSCP-Monomer. (Zur Nucleotidsequenz vgl. Abb. 2.4)

Daten ermittelt nach: Biopolymer calculator <http://paris.chem.yale.edu/extinct.html>
 ExpASy <http://www.expasy.org>
 EMBL <http://www.embl-heidelberg.de>

Nach Transformation des neuen Klon in *E. coli*-Zellen (Stamm JM 101) konnte das Protein WSCP-his darin erfolgreich überexprimiert werden. Die Aminosäuresequenz und einige Eigenschaften des WSCP-his sind in Abb. 3.1 dargestellt. In Abbildung 3.2 ist die Überexpression nach einer Transformation von Zellen mit einem WSCP-his exprimierenden Klon gezeigt. Auf ein 15%-iges PAA-Gel wurde Totalprotein der lysierten *E. coli*-Zellen aufgetragen. Als Negativkontrolle diente die Überexpression einer Wasser-Transformation (-). Bei dem WSCP-his exprimierenden Klon (+) ist deutlich eine Bande zwischen 20 und 24 kD zu erkennen, WSCP-his hat mit 209 Aminosäuren ein Molekulargewicht von ca. 22 kD. Dass es sich bei dem Klon, der für das WSCP-his codiert, um den richtigen, einen Hexahistidylrest enthaltenden Klon handelt, wurde durch Sequenzierung bestätigt (nicht gezeigt, vgl. 2.2.16).

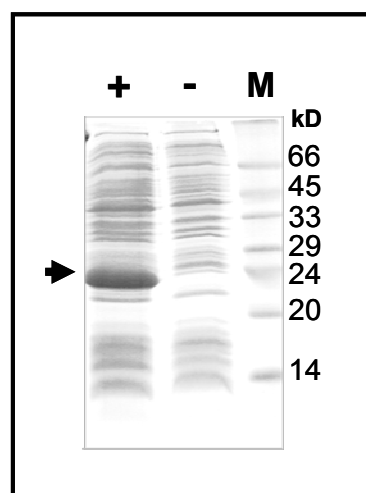


Abb. 3.2: Überexpression von WSCP-his. Nach Transformation von *E. coli*-Zellen mit WSCP-his (+) bzw. Wasser (-) wurde mit einer Induktion im Mini-Maßstab die Überexpression des Proteins getestet (vgl. 2.2.11. u.12). Nach Lyse der Zellen durch 5-minütiges Kochen wurde bakterielles Totalprotein aufgetragen. Der Pfeil kennzeichnet die Lage des WSCP-his-Proteins bei ca. 22 kD. M, Marker; kD, kilodalton

Aufgrund seines Hexahistidylrestes wurde überexprimiertes WSCP-his zunächst über eine mit Nickel-Sepharose beladene Säule aufgereinigt (vgl. 2.3.1). In Abbildung 3.3 sind Überstand (Ü) und Pellet (P) nach dem Zellaufschluss und anschließender Zentrifugation gezeigt, weiter der Durchfluss nach Beladen der Säule (FT), verschiedene Waschschrirte (W) und 4 Eluatfraktionen (E). Es stellte sich heraus, dass etwa die Hälfte des Proteins nicht löslich im Überstand sondern als unlösliche Einschlusskörper vorlagen. Rechts im Bild sind vergleichbare Mengen an Überstand und Pellet aufgetragen (Aliquots von Überstand und Pellet wurden auf gleiche Mengen verdünnt, davon dann gleiche Aliquots aufgetragen). Die Einschlusskörper lagen mit ca. der Hälfte von insgesamt 46 mg WSCP-his aus einem Liter *E. coli* Suspension in großer Menge vor. Da sie und außerdem einen verhältnismäßig sehr geringen Anteil an bakteriellem Protein enthielten (vgl. Abb. 3.3), wurde nach einem DNase-Schritt auf weitere Aufreinigung der Inclusion Bodies verzichtet. Im Folgenden wurde der Überstand nach dem Zellaufschluss für Rekonstitutionen über die Nickel-Säule, das Pellet für Rückfaltungsexperimente aus GuHCl verwendet (vgl. 2.3.10.4 + 5).

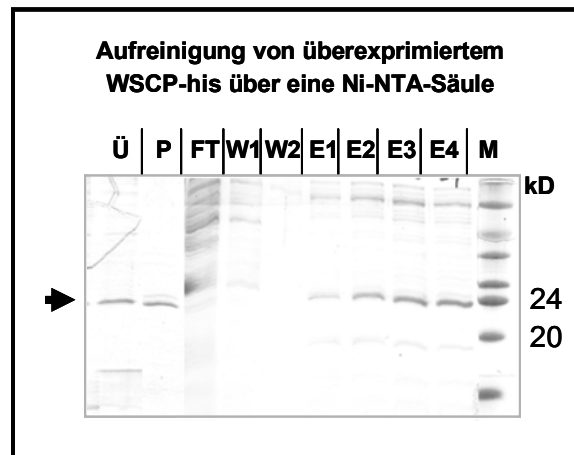


Abb. 3.3: Überexpression und Aufreinigung von WSCP-his. WSCP-his wurde überexprimiert und über eine Nickel-NTA-Säule aufgereinigt (vgl. 2.3.1). Nach jedem Reinigungsschritt wurde eine Fraktion abgezweigt und auf eine 15%-ige SDS-PAGE aufgetragen. Der Pfeil kennzeichnet die Lage des WSCP-his-Proteins. Die beiden linken Spuren zeigen gleiche Anteile an der Gesamtmenge von Überstand (Ü) bzw. Pellet (P) nach dem Zellaufschluss. W1-2, Waschschrirte; E1-4, Eluat; M, Marker; kD, kilodalton.

3.1.4. WSCP-his bildet pigmentabhängig Multimere

Nach Etablierung der Überexpression von WSCP-his wurden in ersten Rekonstitutionsexperimenten die zur Rückfaltung des rekombinanten WSCP-his optimalen Parameter festgestellt. Die Rekonstitutionsmethoden durch Verdünnung aus Guanidinium Hydrochlorid (variiert nach Yang *et al.*, 2003) sowie auf der Nickelsäule erwiesen sich hierbei als die geeignetsten Methoden (nicht gezeigt). Damit sollte nun einleitend der Frage nachgegangen werden, in welcher Aggregationsform das Protein nach erfolgter Rückfaltung mit Pigmenten vorliegt. Satoh und Mitarbeiter (1998) beschrieben für das gefaltete MBP-WSCP Mono- bis Hexamere, wobei Pigment nur von Tetra- und Hexameren gebunden wird. Abbildung 3.4 zeigt ein Rekonstitutionsexperiment, in dem WSCP-his mit Totalpigmentextrakt bzw. als Kontrolle ohne Pigmente rekonstituiert wurde. Der rekonstituierte WSCP-Komplex trennt sich im Deriphat Gel in freies Pigment und eine grüne Bande oberhalb von 66 kD auf (Spur 1). Die anschließende Coomassie-Färbung (Spur 2) zeigt Kolokalisation von Pigment und Protein in derselben Bande. Durch den Vergleich der Laufhöhe der Bande mit der Negativkontrolle ohne Pigmente (Spur 3) kann man ableiten, dass sich bei der Faltung pigmentabhängig Multimere gebildet haben. Die Ergebnisse deuten auf pigmentabhängige Rekonstitution des WSCP-his hin.

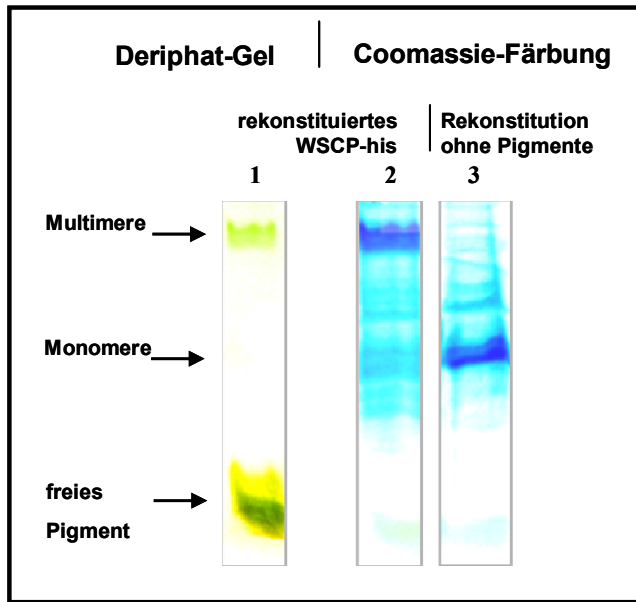


Abb. 3.4: Die Multimerisierung des WSCP-his ist abhängig von der Pigmentbindung. WSCP-his wurde durch Verdünnung aus GuHCl (vgl. 2.3.10.4) mit Totalpigment (Spur 1, 2) bzw. ohne Pigmente (Spur 3) rekonstituiert und auf einem 10%igen Deriphat-Gel aufgetrennt. Spur 1 zeigt das grüne Gel, in den Spuren 2 und 3 sind WSCP-his- und Kontroll-Rekonstitution nach Coomassie-Färbung abgebildet.

Neben der Gelelektrophorese wurde die Saccharosedichtegradientenzentrifugation als weiteres System zur Aufreinigung von rekonstituiertem WSCP-his verwendet (vgl. Abb. 3.5). Native wie auch rekombinante WSCP-Komplexe wurden auf Saccharosedichtegradienten aufgetragen und über Nacht zentrifugiert. Es ist deutlich je eine grüne Bande im Gradienten zu erkennen, bei der Auftrennung von rekombinanten Komplexen werden außerdem die freien Pigmente als Aggregate pelletiert. Beide Proben wurden anschließend auf ein Deriphat-Gel aufgetragen und auch hier wurde die Bildung von Multimeren bestätigt. Native und rekombinante Protein-Pigment-Komplexe zeigten das gleiche Laufverhalten im Dichtegradienten und in einer grünen Bande oberhalb von 66 kD auf gleicher Höhe im Gel. Natives und rekombinantes WSCP bilden also nach Aufreinigung Multimere, die im Deriphat-Gel auf gleicher Höhe laufen. Satoh und Mitarbeiter beschrieben für das native WSCP pigmentierte Tetramere, die diesen Ergebnissen zufolge auch in rekombinanten Komplexen auftreten könnten.

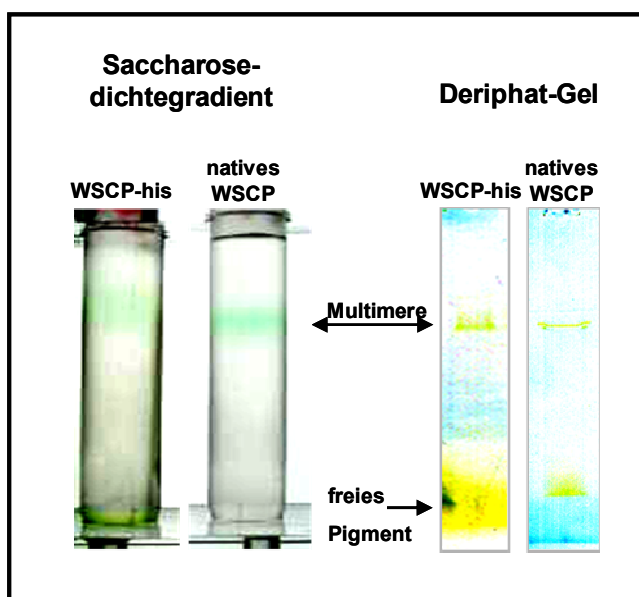


Abb. 3.5: Rekonstituiertes und natives WSCP-his verhalten sich in Saccharosedichtegradienten ähnlich. WSCP-his nach GuHCl-Rekonstitution (vgl. 2.3.10.4) mit Chl a sowie aufgereinigtes natives WSCP wurden auf 0-1 M Saccharosegradienten aufgetragen. Die resultierenden pigmentierten Banden wurden abgesaugt und auf einem 10%-igen Deriphat-Gel analysiert.

3.1.5. Chlorophylle sind essentiell für die Rekonstitution von WSCP-his

Um mehr über die pigmentbindenden Eigenschaften des wasserlöslichen chlorophyllbindenden Proteins zu erfahren, wurden Rekonstitutionsexperimente mit variierendem Pigmentangebot durchgeführt. Eingesetzt wurde jeweils Totalpigmentextrakt (Chl a/Chl b = 3/1, Chlorophyll/Xanthophyll = 1/0,15) aufgereinigtes Chlorophyll a und b sowie Carotinoide. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Abbildungen 3.6 und 3.7 dargestellt. Die Rekonstitutionsansätze wurden zunächst auf ein Deriphat-Gel aufgetragen (Abb. 3.6). Die Rekonstitutionsprodukte der Ansätze mit Totalextrakt, Chlorophyll a und Chlorophyll b trennten sich im Gel in WSCP-Multimere und freies Pigment. Die Spur des mit Carotinoiden rekonstituierten Proteins lässt wie bei der Kontroll-Rekonstitution ohne Protein nur freies Pigment erkennen. Die Coomassie-Färbung zeigt, dass es sich bei den Chlorophyll enthaltenden Banden um pigmentierte Multimere handeln muss, der Ansatz mit Carotinoiden zeigt wie die Rekonstitution ohne Pigment unpigmentierte Monomere.

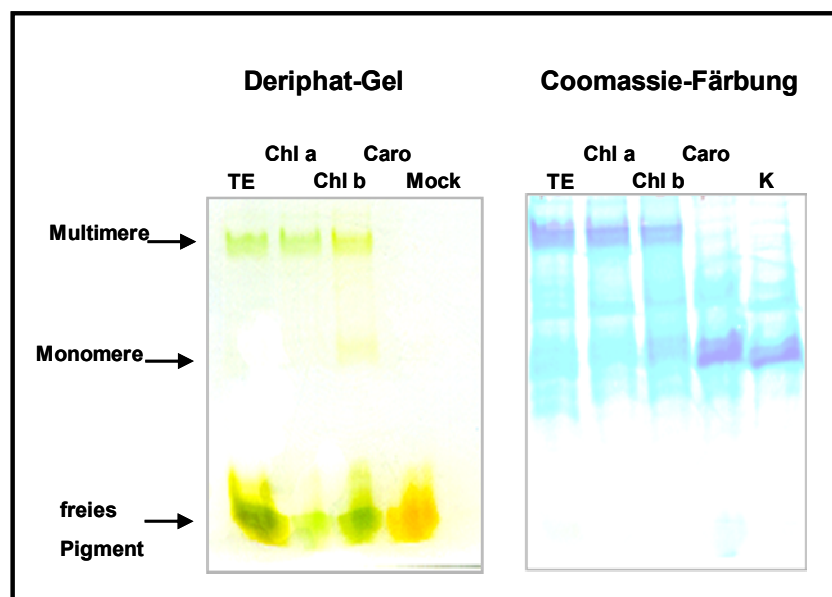


Abb. 3.6: Chlorophylle sind essentiell für die Rekonstitution von WSCP-his. WSCP-his wurde wie in 2.3.10.4 mit Totalextrakt (TE), Chlorophyll a (Chl a), Chlorophyll b (Chl b), Carotinoiden (Caro) sowie ohne Pigmente (K) rekonstituiert und der komplette Rekonstitutionsansatz auf einem 10%-igen Deriphat-Gel aufgetrennt. Gezeigt sind links ein Bild des „grünen“ Geles, rechts nach Coomassie-Färbung die Lage der Proteine. TE, Totalpigmentextrakt; Caro, Gesamtcarotinoide der Erbse.

Gleiche Rekonstitutionsansätze zeigten im Dichtegradienten ein ähnliches Ergebnis. In einem Saccharosegradienten (Abb. 3.7, A) migriert die komplex-spezifische WSCP-Bande oberhalb des freien Pigmentes. Sie ist nur bei den Rekonstitutionsansätzen zu sehen, die Chlorophyll enthalten. Nach Rekonstitution mit Carotinoiden sowie einer Rekonstitution ohne Protein konnte keine Bande oberhalb des freien Pigmentes detektiert werden. Ein anschließendes Deriphat-Gel

ergab, dass sich in den Gradienten mit Totalextrakt, Chlorophyll a und Chlorophyll b pigmentierte Multimere fanden (Abb. 3.7, B). Im Gradient mit Carotinoiden war das Protein-Monomer unspezifisch über den Gradienten verteilt (nicht gezeigt).

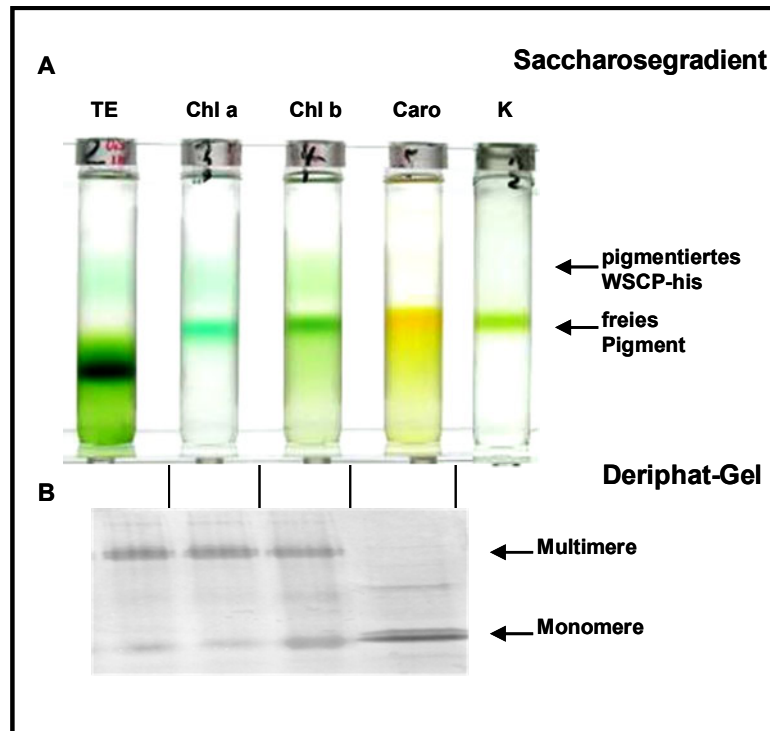


Abb. 3.7: Chlorophylle sind essentiell für die Rekonstitution von WSCP-his. WSCP-his wurde wie in 2.3.10.4 mit Total-extrakt (TE), Chlorophyll a (Chl a), Chlorophyll b (Chl b), Carotinoiden (Caro) sowie ohne Pigmente (K) rekonstituiert und auf einem 0,5 M Saccharosedichtegradienten aufgetrennt (A). Pigmentiertes WSCP-his migriert oberhalb des freien Pigmentes. B: pigmentierte WSCP-his-Banden wurden aus dem Gradienten abgesaugt und auf einem 10%-igen Deriphat Gel analysiert. Gezeigt ist das Gel nach Coomassie-Färbung.

Aus dem Vergleich des Deriphat-Gels mit der Coomassie-Färbung wird deutlich, dass eine Multimerisierung des WSCP-his von der Anwesenheit der Chlorophylle abhängig ist. Zwischen den Proteinbanden nach Rekonstitution mit Carotinoiden und ohne Pigmente ist kein Laufunterschied zu erkennen. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass WSCP-his pigmentabhängig Multimere bildet und dass die zur Rekonstitution essentiellen Pigmente die Chlorophylle darstellen. Carotinoide allein werden weder gebunden noch induzieren sie eine Multimer-Bildung. Da für natives WSCP eine Organisation in vorwiegend Tetrameren beschrieben wurde (Sato *et al.*, 1998), und natives und rekombinantes WSCP im Deriphat-Gel comigrieren, liegt WSCP-his vermutlich ebenfalls in Tetrameren vor.

3.1.6 Pigmentbindende Eigenschaften des nativen und rekombinanten WSCP-Komplexes.

Welche Pigmente für die Rekonstitution des WSCP notwendig sind, sollte im Folgenden genauer überprüft werden. In vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Chlorophylle für die Rekonstitution von WSCP-his notwendig sind (3.1.4), Carotinoide allein jedoch für die Rekonstitution nicht ausreichen.

Nun stellte sich jedoch die Frage, ob und inwieweit Carotinoide zusätzlich zu den essentiellen Chlorophyllen gebunden werden können. Eine Antwort auf diese Frage sollte die Analyse der Pigment-Protein-Stöchiometrien des rekonstituierten und des nativen WSCP-Komplexes geben. Dazu wurden Rekonstitutionsexperimente durch Verdünnung aus Guanidinium Hydrochlorid (GuHCl) durchgeführt und die rekombinanten wie auch nativen Komplexe über Saccharosedichtegradienten aufgereinigt (vgl. 2.3.13). Anschließend wurden die Pigmente mit Butanol aus der Lösung extrahiert (vgl. 2.3.15) und mittels HPLC-Analyse quantifiziert. Es zeigte sich, dass die WSCP-Proteine sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Chlorophyll a und/oder b binden, in keinem Fall konnten jedoch Carotinoide nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Im nativen WSCP-Komplex ist vergleichsweise mehr Chlorophyll a als b gebunden, das a/b-Verhältnis beträgt ca. 17 ($16,7 \pm 1,5$). Um nun Informationen darüber zu erhalten, ob eine Chlorophyll-Art bevorzugt an das WSCP-his bindet, wurden Konkurrenzexperimente mit variierendem a/b-Verhältnis im Angebot durchgeführt. Es zeigte sich jedoch keine Präferenz gegenüber einem Pigment; mit steigendem Chl a-/Chl b-Verhältnis im Angebot stieg gleichermaßen auch das Verhältnis des im Komplex gebundenen Pigmentes (Abb. 3.8). Aus den Ergebnissen dieser Chlorophyll a/Chlorophyll b-Titration lässt sich keine eindeutige Präferenz des Proteins für eines der Chlorophylle erkennen, Chlorophyll a und b können im WSCP-Komplex gleich stark gebunden vorliegen.

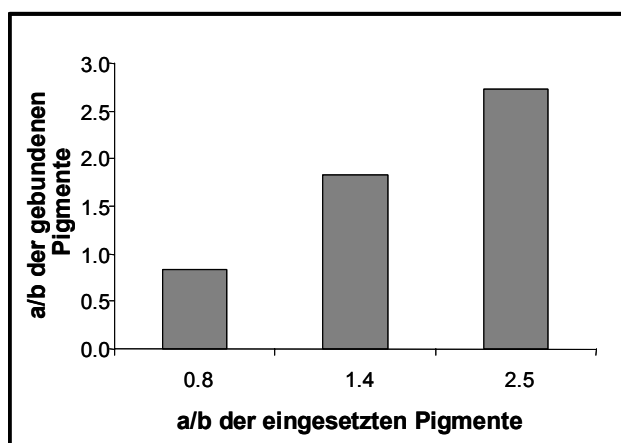


Abb. 3.8: Chl a-/Chl b-Titration. WSCP-his wurde aus GuHCl mit Chl a und Chl b in steigendem Verhältnis rekonstituiert (vgl. 2.3.10.4). Die rekombinanten Komplexe wurden über Saccharosedichtegradienten aufgereinigt, die Pigmente extrahiert und mit HPLC-Analyse quantifiziert (vgl. 2.2.16). Molare Chl a-/Chl b-Verhältnisse der eingesetzten und der gebundenen Pigmente sind gegeneinander aufgetragen.

Neben den relativen pigmentbindenden Eigenschaften des Proteins sollten auch Protein-Pigment-Stöchiometrien untersucht werden. Da sich in rekombinanten Komplexen weder für Chlorophyll a noch b eine eindeutige Präferenz ergeben hatte, wurde WSCP-his hierfür aus praktischen Gründen mit aufgereinigtem

Chlorophyll a rekonstituiert und über Saccharosedichtegradienten aufgereinigt. Die Proteinmenge wurde nach acetonischer Fällung, wie unter 2.3.3.1 beschrieben, photometrisch quantifiziert. Die Pigmentkonzentration wurde nach butanolischer Extraktion (2.3.15) mittels HPLC Analyse bestimmt. Aus beiden Werten wurden unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes die molaren Protein-Pigment-Stöchiometrien errechnet. Es ergab sich ein Wert von 0,5 (\pm 0,2) Chlorophyllen pro rekombinatem WSCP, der Literaturwert ist mit 0,5 Chlorophyllen pro nativem WSCP gleich. Von Satoh und Mitarbeitern (1998) wurde beschrieben, dass sich der größte Teil der WSCP-Komplexe in pigmentbindenden Tetrameren organisiert. Berücksichtigt man das, kommt man auf eine Stöchiometrie von 2 (\pm 0,8) Chlorophyllen pro Proteintetramer. Der Wert von näherungsweise zwei Chlorophyllen, die in einem rekombinanten bzw. nativen WSCP-Tetramer gebunden vorliegen, entspricht dem in der Literatur beschriebenen, von Satoh gemessenen Wert.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass native wie auch rekombinante WSCP-Tetramere zwei Chlorophyll-Moleküle, jedoch keine Carotinoide binden.

3.1.7 Rekonstituiertes WSCP-his und natives WSCP haben gleiche spektroskopischen Eigenschaften

Im Folgenden sollten die durch Rekonstitution erhaltenen rekombinanten WSCP-Komplexe mit dem nativen WSCP aus Blumenkohlblättern spektroskopisch verglichen werden. Aus den Untersuchungen zum Pigmentbindeverhalten (3.1.6) konnte entnommen werden, dass im nativen und rekombinanten Komplex gleich viele Pigmente im gleichen molaren Verhältnis gebunden sind. Mittels Zirkular-Dichroismus-Spektroskopie kann man nun ermitteln, ob die Chromophore in einem Protein-Pigment-Komplex untereinander excitonische Wechselwirkungen eingehen. Mit Fluoreszenzmessungen können dann beispielsweise Aussagen über die funktionelle Kopplung der Pigmente getroffen werden, z.B. ob sich bei den wechselwirkenden Chlorophyllen auch Energietransfer feststellen lässt.

3.1.7.1. Absorption

Zunächst wurden vergleichende Absorptionsspektren aufgenommen. Das Absorptionsspektrum einer Probe von rekonstituierten aufgereinigten Protein-Pigment-Komplexen liefert grundlegende Informationen über die in der Probe und damit die im Komplex enthaltenen Pigmente. WSCP-his wurde durch Verdünnung aus GuHCl rekonstituiert. Dem Rekonstitutionsansatz wurde Totalpigmentextrakt, Chlorophyll a oder Chlorophyll b zugesetzt. Die rekonstituierten Komplexe sowie natives WSCP wurden anschließend über detergensfreie Dichtegradienten aufgereinigt. Die resultierenden Banden wurden abgesaugt und photometrisch

vermessen. Die Abbildung 3.9 zeigt Absorptionsspektren der Protein enthaltenden Banden. Hier wird ersichtlich, dass im roten Spektralbereich nicht nur bei Komplexen mit Chlorophyll a sondern auch bei Totalextrakt und nativem WSCP der Chlorophyll a-Peak bei 672 nm dominiert. Das Spektrum der mit Chlorophyll b rekonstituierten Komplexe ist deutlich in den grünen Spektralbereich verschoben, was der Peak bei 656 nm andeutet. Mit Totalextrakt rekonstituiertes WSCP-his zeigt um 656 nm eine deutliche Chlorophyll b-Schulter, was auf einen Chlorophyll b-Anteil in diesen Komplexen hindeutet. Natives WSCP weist diese Schulter nicht auf, das Spektrum gleicht sowohl im roten als auch im blauen Spektralbereich dem der WSCP-his-Chlorophyll a-Komplexe. Im Blauen unterscheidet es sich durch eine leichte Chlorophyll b-Schulter um 460 nm, was auf einen relativ geringen Anteil an Chlorophyll b im nativen Komplex hindeutet. Die Chlorophyll b-Schulter bei 460 nm ist bei mit Totalextrakt rekonstituiertem WSCP sehr viel stärker ausgeprägt. Das bestätigt das Ergebnis, dass mit steigender Chlorophyll b-Menge im Angebot auch mehr davon im Komplex gebunden wird.

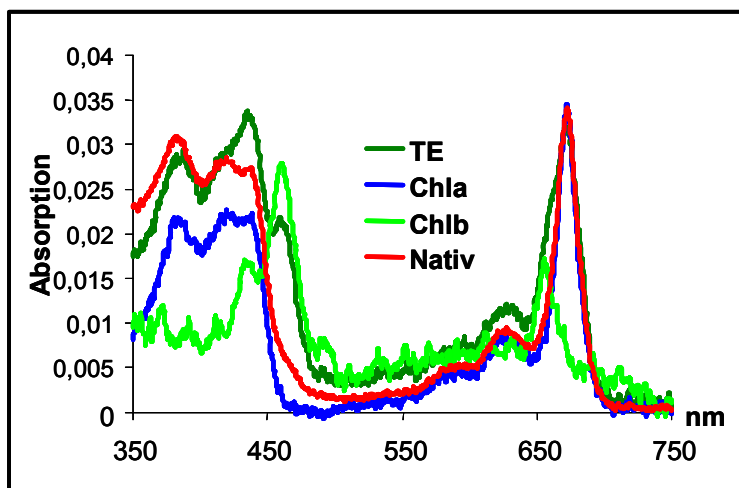


Abb. 3.9: Absorption von rekonstituiertem und nativem WSCP im detergentenfreien Gradienten im Vergleich. WSCP-his wurde mit Chl a, Chl b und Totalpigmentextrakt (TE) rekonstituiert (vgl. 3.3.10.4). Die Komplexe wie auch natives WSCP wurden über detergentenfreie Saccharosedichtegradienten aufgereinigt (vgl. 3.3.13).

Das Absorptionsspektrum gibt Aufschluss über die Anwesenheit von Pigmenten in den über Dichtegradienten aufgereinigten Komplexen, man kann daraus jedoch nicht auf die funktionelle Kopplung von Protein und Pigment schließen. Um WSCP-Komplexe hinsichtlich dieses Punktes zu untersuchen, wurden sie CD-spektroskopisch vermessen.

3.1.7.2. CD-Spektroskopie

In Abbildung 3.10 sind CD-Spektren von nativem WSCP (A) sowie durch Verdünnung aus GuHCl mit Totalextrakt (B) und über eine Nickelsäule mit Chlorophyll a (C) rekonstituiertem WSCP-his vergleichend aufgetragen. Die Spektren A-C unterscheiden sich nicht voneinander. Im roten Spektralbereich weisen sie ein Minimum bei 666 nm und ein Maximum bei 680 nm auf, der Nulldurchgang liegt bei 674,5 nm. Im Blauen sind Minima bei 442 und 423 nm mit

einem dazwischenliegenden Maximum bei 430 nm zu erkennen. Anhand des charakteristischen Verlaufes der Maxima und Minima mit Durchlaufen der Nulllinie bei den Absorptionsmaxima der interagierenden Pigmente zeigt sich excitonische Kopplung der Chromophore. Die zur Bildung des CD-Signals des nativen Proteins notwendigen Pigmente sind also in gleicher räumlicher Anordnung auch in Komplexen vorhanden, die mit unterschiedlichem Pigmentangebot und mit verschiedenen Methoden rekonstituiert worden sind.

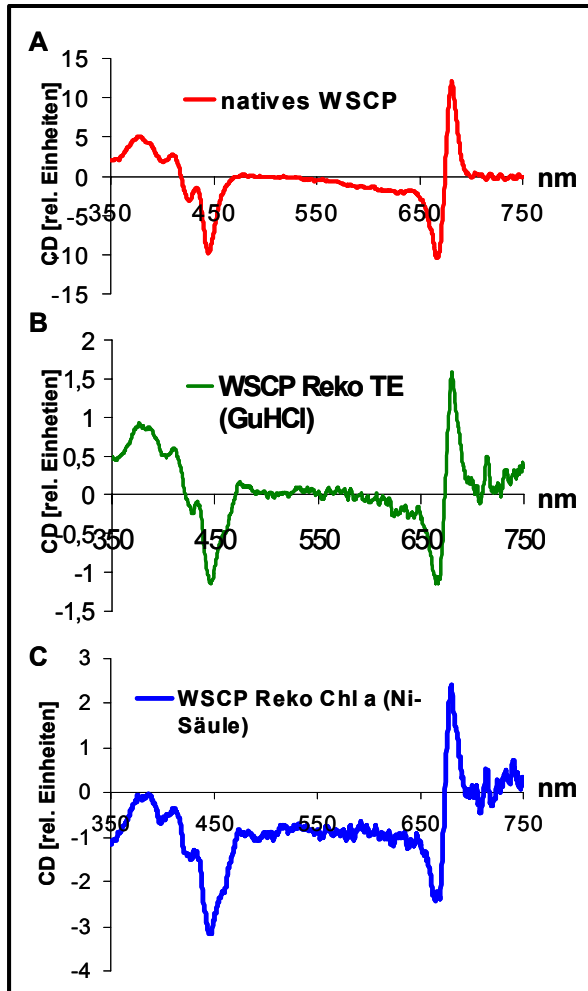


Abb. 3.10: CD-Spektren von WSCP-Pigment-Komplexen. Nach Rekonstitution von WSCP-his mit Totalpigment aus GuHCl (vgl. 3.3.10.4) (B) und mit Chlorophyll a auf der Nickel-Säule (vgl. 3.3.10.5) (C) sowie von nativem WSCP (A) wurden CD-Spektren wie in 2.4.2 beschrieben aufgenommen. TE, Totalextrakt

Abb. 3.11: CD-Spektren von WSCP-his mit steigendem Chlorophyll b- Gehalt. WSCP-his wurde aus GuHCl mit Chl a, Chl b und Chl (a/b = 1/1) rekonstituiert (vgl. 3.3.10.4) und über Saccharosedichtegradienten aufgereinigt.

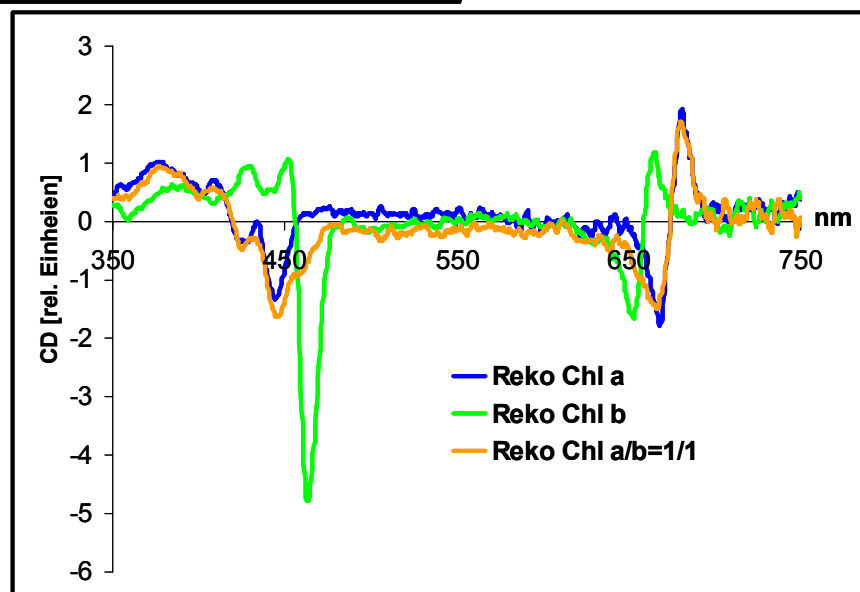


Abbildung 3.11 zeigt CD-Spektren von gefaltetem WSCP-his nach Rekonstitution mit jeweils aufgereinigtem Chlorophyll a und b sowie einem 1:1-Gemisch beider Pigmente. Es wird deutlich, dass beide Chlorophyll-Spezies excitonische Wechselwirkungen entweder mit dem Protein oder anderen Pigmenten eingehen. Mit erhöhtem Anteil an Chlorophyll b im Komplex bilden sich Schultern um 470 nm wie auch um 660 nm aus. Nur mit Chlorophyll b rekonstituierte Komplexe zeigen deutlich in den grünen Absorptionsbereich verschobene Minima, was vermuten lässt, dass auch Chlorophyll b excitonisch im Komplex gekoppelt vorliegt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass pigmentiertes WSCP-his nach Rekonstitution mit reinem Chlorophyll a oder b bzw. mit einem Gemisch aus beiden stets ein CD-Signal zeigt, das jedoch mit steigendem Chlorophyll b-Anteil in den grünen Spektralbereich verschoben ist. Diese Verschiebung entspricht dem Absorptionsspektrum von Chlorophyll b. Die Pigmente zeigen also in jedem der Komplexe excitonische Wechselwirkungen zu anderen Pigmenten oder dem Protein.

3.1.7.3. Fluoreszenz

Mit Fluoreszenzspektren kann man Informationen über funktionelle Kopplung der Pigmente im Komplex erhalten sowie über den Energietransfer zwischen gebundenen Pigmenten. Abbildung 3.12 zeigt vergleichend Fluoreszenz-emissionsspektren von nativem WSCP und rekonstituiertem, aufgereinigtem WSCP-his nach Excitation bei 410 nm. Die Spektren sind nahezu gleich, es ist also nach selektiver Chlorophyll a-Anregung zwischen nativem und mit Chlorophyll a rekonstituiertem rekombinantem Komplex kein Unterschied im Emissionsmaximum zu erkennen. Zu beachten sei hier aber auch, dass das native WSCP mit 17:1 einen recht hohen Chlorophyll a/b Gehalt aufweist. Diese, wie auch die Proben für die Spektren in Abbildung 3.13, sind über Saccharosedichtegradienten aufgereinigt, die 0,1% LM enthielten. In dieser Umgebung wurde der Energietransfer von Chlorophyll b nach Chlorophyll a bei mit Totalpigmentextrakt rekonstituiertem WSCP und der Rekonstitution ohne Protein gemessen (Abb. 3.13). Der Energietransfer wird abgeschätzt, indem man die auf gleiche Chlorophyllkonzentration eingestellte

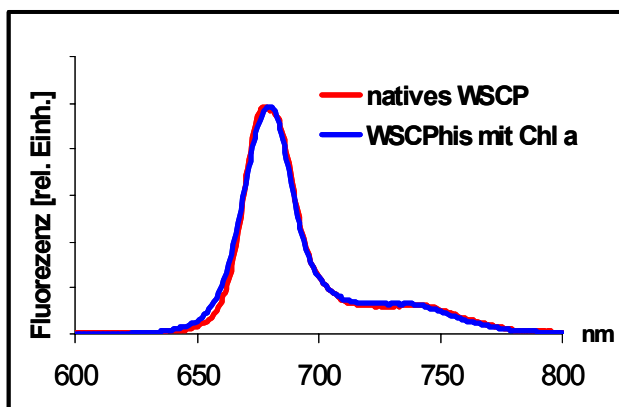
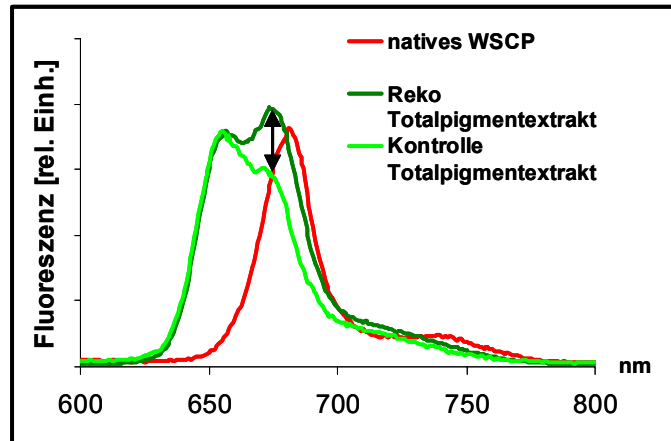


Abb. 3.12: Fluoreszenzemission (Ex. 410 nm) von rekonstituiertem WSCP-his im Vergleich zu nativem WSCP nach Aufreinigung über Saccharosegradienten mit 0,1% Dodecylmaltosid (LM). WSCP-his wurde aus GuHCl rekonstituiert (vgl. 3.3.9.4) und über einen Dichtegradienten aufgereinigt. Chlorophyll a wurde selektiv bei 410 nm angeregt, und die Fluoreszenzemissionsspektren (vgl. 2.4.3) des rekonstituierten und des nativen Komplexes vergleichend aufgetragen.

Abb. 3.13: Fluoreszenzemission (Ex. 470 nm) von rekonstituiertem WSCP-his im Vergleich zur Kontroll-Rekonstitution und nativem WSCP nach Aufreinigung über Saccharosegradienten mit 0,1% Dodecylmaltosid (LM). Nach GuHCl-Rekonstitution mit Totalpigment (vgl. 3.3.10.4) und Aufreinigung über einen Saccharosegradienten mit 0,1% LM (vgl. 2.3.13) wurde nach selektiver Chl b-Anregung bei 470 nm ein Fluoreszenzemissionsspektrum (vgl. 2.4.3)



im Vergleich zur Kontroll-Rekonstitution und zum nativen WSCP aufgenommen. Der Pfeil zeigt für die Rekonstitution ein signifikantes Maximum bei 676 nm, Chl b-Excitation von nativem WSCP führt zu Chl a-Emission bei 680 nm.

Rekonstitution sowie die Kontrolle selektiv bei 470 nm (Chlorophyll b) anregt und die Emissionen bei 680 nm (Chlorophyll a) vergleicht. Das Emissionsspektrum nach selektiver Chlorophyll b-Anregung zeigt für die rekonstituierte Probe einen höheren Chlorophyll a-Peak als es in der Kontrolle ohne Protein zu erkennen ist. Daraus lässt sich ableiten, dass in der Probe mit Protein ein signifikant höherer Energietransfer stattfindet als in der Kontroll-Rekonstitution.

Nach Rekonstitution mit Chlorophyll a und Totalpigment und anschließender Aufreinigung über einen detergensfreien Dichtegradienten wurden die Fluoreszenzemissionsspektren nach selektiver Chlorophyll b-Anregung bei 470 nm mit dem des nativen Komplexes verglichen (Abb. 3.14). Es zeigte sich sehr große Ähnlichkeit der Spektren, und im Hinblick auf den Chlorophyll a/b-Gehalt der mit Totalpigment rekonstituierten Probe von 1,5 kann man von einem vollständigen Energietransfer von Chlorophyll b nach Chlorophyll a sprechen. Das kann für das native WSCP aufgrund seines niedrigen Chlorophyll b Gehaltes jedoch nur eingeschränkt behauptet werden.

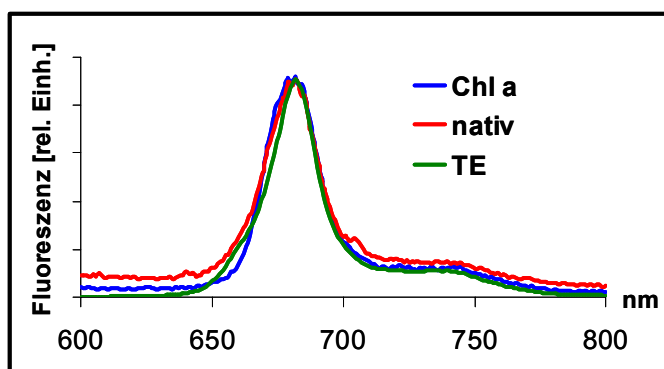


Abb. 3.14: Fluoreszenzemissionsspektren nach Excitation bei 470 nm: rekonstituiertes WSCP-his im Vergleich zu nativem WSCP nach Aufreinigung über detergensfreie Saccharosegradienten. Rekonstitution von WSCP-his erfolgte aus GuHCl (vgl. 2.3.9.4) mit anschließender Auftrennung auf einem detergensfreien Gradienten (vgl. 2.3.12). Die Proben wurden selektiv bei 470 nm angeregt und die Fluoreszenzemissionsspektren (vgl. 2.4.3) vergleichend aufgetragen.

Auch aus Fluoreszenzexcitationsspektren mit festgelegter Emission bei 680 nm ist eine große Ähnlichkeit des nativen und des rekombinanten, mit Chlorophyll a rekonstituierten Komplexes ersichtlich (vgl. Abb. 3.15). Das Spektrum des nativen

WSCP, welches ein relativ hohes Chlorophyll a/b-Verhältnis hat, weist eine leichte Chlorophyll b-Schulter um 467 nm auf. Das lässt auf einen Beitrag von Chlorophyll b zur Chlorophyll a-Fluoreszenz schließen. Das Excitationsspektrum der mit Chlorophyll b rekonstituierten Komplexe ist in den grünen Spektralbereich verschoben, es finden sich Maxima bei 462 und 440 nm.

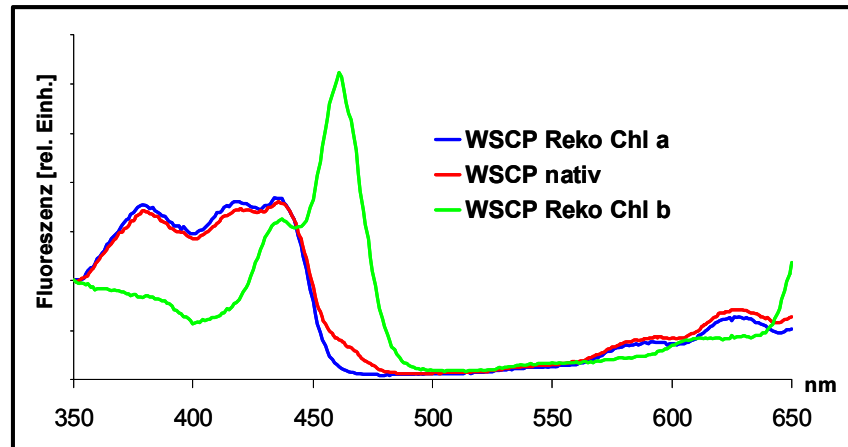


Abb. 3.15: Fluoreszenzexcitationsspektren (Em. 680nm) von WSCP-his rekonstituiert mit Chl a bzw. b im Vergleich zu nativem WSCP. Rekonstitution von WSCP-his erfolgte aus GuHCl (vgl. 3.3.10.4) mit anschließender Auftrennung auf detergensfreien Gradienten (vgl. 3.3.13). Fluoreszenzexcitationsspektren (vgl. 2.4.3) wurden mit festgesetzter Emission bei 680 nm aufgenommen.

Aus den bisher gezeigten Ergebnissen geht hervor, dass das native WSCP und der rekombinante, mit Chlorophyll a rekonstituierte Komplex spektroskopisch gleich oder sich zumindest sehr ähnlich sind. Des Weiteren weisen beide gleiche Pigment-Protein-Stöchiometrien auf. Somit ist nun mit dem rekombinanten WSCP-Komplex ein Werkzeug vorhanden, mit dem nähere Untersuchungen zur Funktion des Proteins relativ einfach und ohne Abhängigkeit von nativem Material durchgeführt werden können.

3.1.8 WSCP-his bindet die Chlorophyll-Vorstufen Chlorophyllid und Mg-Protoporphyrin IX

Um der Hypothese nachzugehen, ob WSCP eine Rolle als Carrier-Molekül in der Biosynthese oder dem Abbau von Chlorophyllen spielen könnte, wurden Rekonstitutionsexperimente mit verschiedenen Pigmentderivaten durchgeführt. Darunter waren Chlorophyll-Vorstufen wie beispielsweise Chlorophyllid, Abbauprodukte wie Phäophytin oder Derivate mit substituiertem Zentralatom (vgl. Tab 3.1). WSCP-his wurde durch Verdünnung aus GuHCl mit dem jeweiligen Pigment rekonstituiert und auf ein Deriphat-Gel aufgetragen. Abbildung 3.16. zeigt die grünen Deriphat-Gele sowie die anschließende Coomassie-Färbung. Das mit A1 bezeichnete Gel zeigt grüne Banden auf der Höhe von Multimeren nach

Rekonstitution mit Chlorophyll a, Bakteriochlorophyll a und Zn-Phäophytin a. Das Coomassie-gefärbte Gel bestätigt dieses Ergebnis; Multimer-Bildung erfolgt nur in Gegenwart der genannten Pigmente. Das Deriphat-Gel unter B1 lässt nach Rekonstitution mit Zn-Phäophorbid a und Chlorophyllid a grüne Banden erkennen, die allerdings wesentlich tiefer laufen, als die oben beschriebenen Multimere. Die Coomassie-Färbung bestätigt die Vermutung, dass es sich hierbei um pigmentierte WSCP-Monomere handeln muss. Tabelle 3.1 fasst diese Ergebnisse nochmals zusammen. WSCP-his lässt sich in Gegenwart von Pigmenten zu Multimeren rekonstituieren, die Magnesium oder Zink als Zentralatom haben, sowie einen Phytolrest besitzen. Die Chlorophyll a-Derivate mit Kupfer als Zentralatom werden

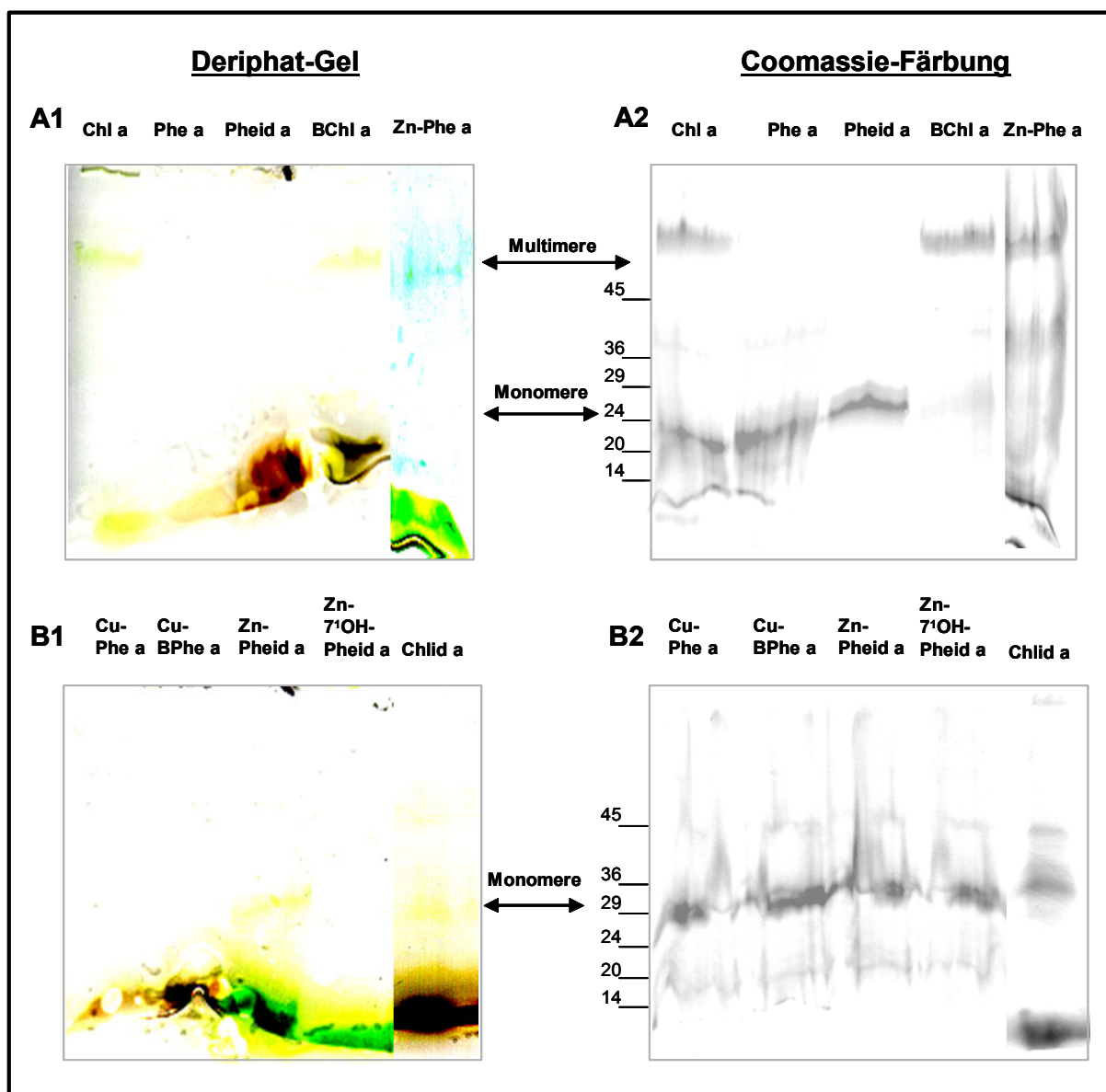


Abb. 3.16: Rekonstitution von WSCP-his mit verschiedenen Chlorophyll-Derivaten. WSCP-his wurde aus GuHCl mit verschiedenen Chlorophyll-Vorstufen, Derivaten und Abbauprodukten rekonstituiert (vgl. 3.3.10.4) und die Rekonstitutionsprodukte auf ein 10%-iges Deriphat-Gel aufgetragen. A1 und B1 zeigen Scans der grünen Gele, B1 und B2 die Coomassie-Färbung. Die Ergebnisse dieser Gele sind in der Tabelle 3.1 nochmals zusammengefasst. BPhe, Bakteriophäophytin; BChl, Bakteriochlorophyll; Chl, Chlorophyll; Chlid, Chlorophyllid; Phe, Phäophytin; Pheid, Phäophorbid.

nicht gebunden. Pigmentierte Monomere werden mit Derivaten gebildet, die Magnesium oder Zink als Zentralatom haben, denen aber der Phytolrest fehlt. Die zusätzliche Hydroxylgruppe des Zn-7¹OH Phäophorbid a scheint ebenfalls eine sterische Situation zu schaffen, die eine Bindung an das Protein nicht mehr möglich macht. Des Weiteren erfolgt eine Rekonstitution nicht mit Pigmenten ohne Zentralatom wie Phäophytin a und beispielsweise Phäophorbid a, dem zum Zentralatom auch der Phytolrest fehlt.

Es werden mit Ausnahme von Chlorophyllid keine Chlorophyll-Degradationsprodukte gebunden. Diese Ergebnisse widersprechen einer möglichen Rolle des wasserlöslichen Chlorophyllproteins aus Blumenkohl als Seneszenzprotein. Allerdings könnte die Bindung von Chlorophyllid in monomeren Protein-Pigment-Komplexen darauf hindeuten, dass es sich hier tatsächlich um ein Carrier-Molekül handeln könnte, welches Pigment-Vorstufen zum Ort der Synthese transportiert.

Pigment	Rekonstitution	Multimerisierung	
Chl a	+	+	Zentralatom und Phytolrest vorhanden
Chl b	+	+	
B Chl a	+	+	
Zn-Phe a	+	+	
Cu-Phe a	-	-	Zentralatom vorhanden, Phytolrest fehlt
Cu-B Phe a	-	-	
Chlid a	+	-	Zentralatom vorhanden, Phytolrest vorhanden
Chlid b	+	-	
Mg-Proto IX	+	-	
Zn-Pheid a (Zn-Chlid a)	+	-	Zentralatom fehlt, Phytolrest vorhanden
Zn-7¹OH Pheid a	-	-	
Phe a	-	-	Zentralatom und Phytolrest fehlen
Pheid a	-	-	

Tab. 3.1.: WSCP-his rekonstituiert aus GuHCl mit verschiedenen Chlorophyll-Derivaten. Pigmentbindung sowie Comigration mit nativem WSCP sind durch „+“ gekennzeichnet. BPhe, Bakteriophäophytin; BChl, Bakteriochlorophyll; Chl, Chlorophyll; Chlid, Chlorophyllid; Mg- Proto IX, Mg- Protoporphyrin IX; Phe, Phäophytin; Pheid, Phäophorbid.

Um zu überprüfen, ob Chlorophyllid excitonisch gekoppelt vorliegt, wurde WSCP-his mit Chlorophyllid b aus GuHCl rekonstituiert. Anschließend wurden beide Rekonstitutionsprodukte CD-spektroskopisch vermessen (Abb. 3.17). Schon zuvor war gezeigt worden, dass Rekonstitution mit Chlorophyllid a zu pigmentierten Monomeren führt. Die CD-Spektren zeigen Signale, die denen der WSCP-Komplexe mit Chlorophyllen entsprechen. In Abbildung 3.17 A ist ein WSCP-his-Chlorophyllid b-Spektrum zu sehen, welches im roten Spektralbereich ein Minimum bei 644 nm und ein Maximum bei 662 nm aufweist. Der Nulldurchgang dieses Doppelpeaks liegt bei 655 nm, dem Absorptionsmaximum von Chlorophyllid b (nicht gezeigt). Im blauen Spektralbereich zeigt das Spektrum ein Maximum bei 463 nm und einen Nulldurchgang bei 460 nm. Spektrum B zeigt das CD-Signal rekombinante Chlorophyllid a-Komplexe. Der Nulldurchgang im Roten bei 680 nm sowie der im Blauen (440 nm) entsprechen den Absorptionsmaxima eines Chlorophyllid a Spektrums. Zur Kontrolle wurde ein CD-Spektrum von Chlorophyllid a in ähnlicher Konzentration in gleicher wässriger Lösung gemessen (Abb. 3.17 C). Es zeigten sich verschobene Maxima, die zudem sehr stark waren, so dass man auf Aggregatbildung des Chlorophyllides in wässriger Umgebung schließen könnte. Da die Signale jedoch in ähnlichen Bereichen liegen wie die der Rekonstitutionsprodukte, kann keine definitive Aussage über excitonische Wechselwirkungen in einem WSCP-Chlorophyllid-Komplex getroffen werden.

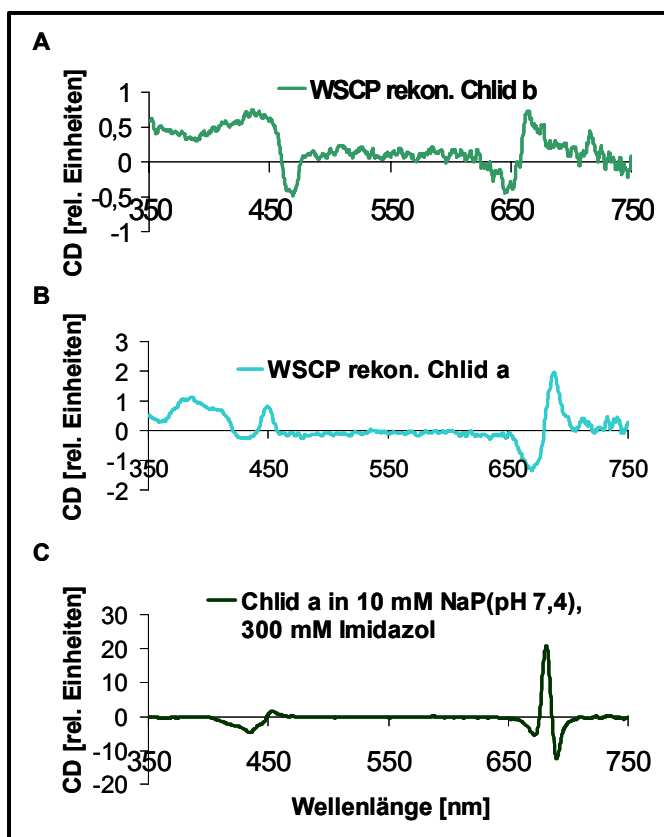


Abb. 3.17: CD-Spektren von WSCP-his-Chlorophyllid-Komplexen. WSCP-his wurde mit Chlorophyllid (Chlid) b aus GuHCl (vgl. 3.3.10.4) (A) und mit Chlorophyllid a auf der Nickel-Säule (vgl. 3.3.10.5) (B) rekonstituiert. Chlorophyllid a allein (C) wurde in wenig 100%-igem Ethanol vorgelöst und in Eluatpuffer (10 mM Natriumphosphat pH 7,8, 300 mM Imidazol) vermessen.

Wenn WSCP eine Rolle im Chlorophyll-Synthesestoffwechsel spielt, wäre es denkbar, dass dieses Protein neben Chlorophyllid noch andere Chlorophyll-

Vorläufer binden kann. Dazu wurde WSCP-his auf der Nickelsäule mit einem früheren Intermediat, Mg-Protoporphyrin IX, rekonstituiert. Nach stringentem Waschen ließ sich pigmentiertes WSCP von der Säule eluieren. Nach schwach denaturierender PAGE war eine pigmentierte Bande auf der Höhe von WSCP-Monomeren detektierbar (nicht gezeigt, vgl. auch Tab. 3.1). Die Bindung von Mg-Protoporphyrin IX scheint jedoch relativ instabil zu sein, da sich unterhalb der pigmentierten Bande freies Pigment befand.

3.1.9 WSCP ist ein photostabiles und hitzestabiles Protein

Aus den bisher beschriebenen Untersuchungen zur Pigmentbindung des WSCP ging hervor, dass im nativen, wie auch im rekombinanten Komplex pro Proteintetramer nur zwei Chlorophyllmoleküle, jedoch keine Carotinoide gebunden werden. Aufgrund der Hypothese, WSCP könnte eine Funktion als Pigmentcarrier unter Stressbedingungen übernehmen, wurden im Folgenden Experimente zur Stabilität in Bezug auf Licht- und Hitzestress durchgeführt.

3.1.9.1. Photostabilität

Die Photostabilität des rekombinanten WSCP-Komplexes wurde durch Belichtung aufgereinigter Komplexe mit Starklicht überprüft. WSCP-his wurde durch Verdünnung aus GuHCl mit Chlorophyll a rekonstituiert und über Saccharosedichtegradienten aufgereinigt. Als Negativkontrolle wurde eine Kontroll-Rekonstitution ohne Protein mitgeführt. Die Proben wurden über eine Stunde hinweg mit $500 \mu\text{mol e}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ bestrahlt. Fluoreszenzemissionsspektren wurden

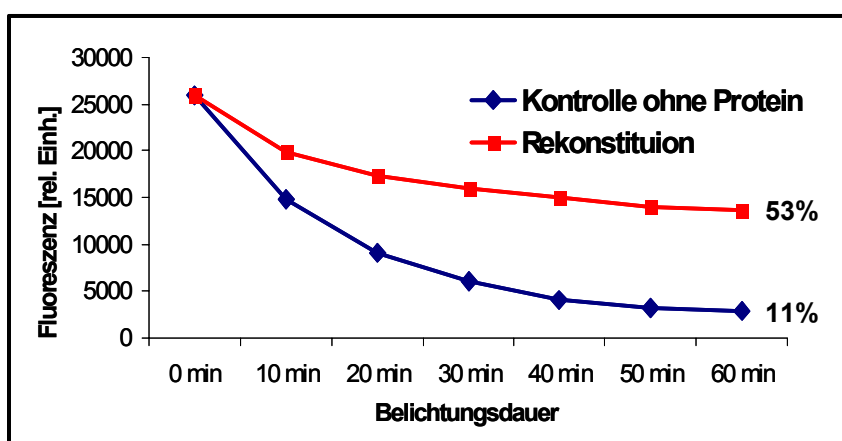


Abb. 3.18: Photostabilität des rekonstituierten WSCP-his. WSCP-his wurde mit Chl a rekonstituiert (vgl. 2.2.9.4) und mit $500 \mu\text{mol e}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ belichtet. Alle 10 Minuten wurde ein Emissionsspektrum nach Chl a-Anregung bei 410 nm aufgenommen (vgl. 2.4.3). Die Abbildung zeigt die Emissions-Detektion bei 676 nm über die Zeit.

alle 10 Minuten nach selektiver Chlorophyll a-Anregung bei 410 nm aufgenommen und die Chlorophyll a-Emission bei 680 nm gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 3.18). Die Fluoreszenz der rekonstituierten Probe nahm bis auf 53% des Ausgangswertes ab, verringerte sich also um ca. die Hälfte. Die Fluoreszenz der Kontroll-Rekonstitution, die nur Chlorophyll a aber kein Protein enthielt, sank um fast 90% des Ausgangswertes bis auf 11% ab. Fluoreszenzabnahme aufgrund von Aggregation kann ausgeschlossen werden (nicht gezeigt), da eine verstärkte längerwellige Fluoreszenz, hervorgerufen durch Chlorophyll-Aggregate, nicht detektiert werden konnte.

Die Resultate aus den Versuchen zur Photostabilität deuten an, dass das WSCP, welches wie gezeigt keine Carotinoide bindet, einen anderen Weg gefunden haben muss, um gebundene Pigmente vor Schaden durch Photooxidation zu schützen und somit die fehlende Funktion von Carotinoiden anderweitig zu gewährleisten. Um mehr Informationen über diesen möglicherweise wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Funktion des WSCP zu erhalten, wurden in Zusammenarbeit mit Anja Krieger-Liskay und Christian Fufezan am Institut für Biologie II an der Universität Freiburg Spin-Trap EPR (electron-paramagnetic resonance) durchgeführt.

3.1.9.2. WSCP schützt vor Bildung von Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$)

Bei photooxidativem Stress spielen in Protein-Pigment-Komplexen gebundene Carotinoide eine große Rolle als terminaler Energieakzeptor. Fehlen sie, kann Chlorophyll durch Anregung in den Triplettzustand übergehen. Triplett-Chlorophyll

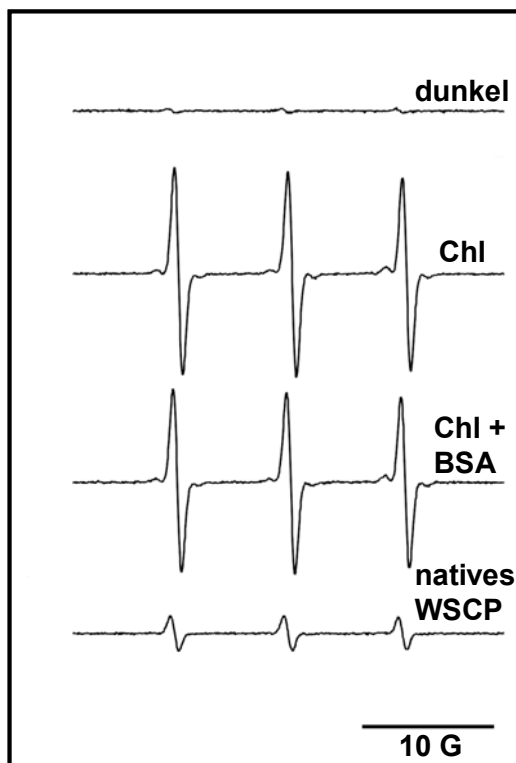


Abb. 3.19: Elektronenspin-Resonanzspektroskopie (EPR) zur Detektion von Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$). Die Bildung von $^1\text{O}_2$ wurde über die Reaktion mit TEMP (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin) zum Nitroxylradikal TEMPO detektiert. Dargestellt sind die EPR-Signale von nativem WSCP, Chl und Chl + BSA in gleicher Chlorophyllkonzentration und Puffer nach Belichtung mit $150 \mu\text{mol} \cdot \text{e}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ sowie eine Dunkelkontrolle. G, Gauss. (Diese Messungen wurden von Christian Fufezan und Anja Krieger-Liskay in Freiburg durchgeführt.)

kann Sauerstoff anregen und ihn so in den Singulettzustand ($^1\text{O}_2$) überführen. Diese reaktive Form des Sauerstoffs kann mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (EPR) detektiert werden, indem man den $^1\text{O}_2$ mit TEMPO zu dem messbaren Nitroxylradikal TEMPO reagieren lässt. Abbildung 3.19 zeigt das charakteristische EPR-Signal von TEMPO nach Belichtung (10 Minuten, $150 \mu\text{mol} \cdot \text{e}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) von nativen WSCP-Komplexen bzw. freiem Pigment sowie Kontrollen mit BSA und ohne Belichtung. Die Proben wurden auf gleiche Chlorophyll-Absorption eingestellt. Die Dunkelkontrolle zeigt ein geringes Hintergrundsignal, welches durch Verunreinigungen der Spin-Trap entsteht. Das starke TEMPO-Signal der Probe mit freiem Chlorophyll verringert sich nur wenig, wenn der Probe BSA als Proteinkomponente zugesetzt wird. Das native WSCP hingegen zeigt nach Belichtung ein deutlich reduziertes Signal. Es entsteht weniger TEMPO, was bedeutet, dass die $^1\text{O}_2$ -Bildung durch Triplett-Chlorophyll in Gegenwart von WSCP reduziert ist.

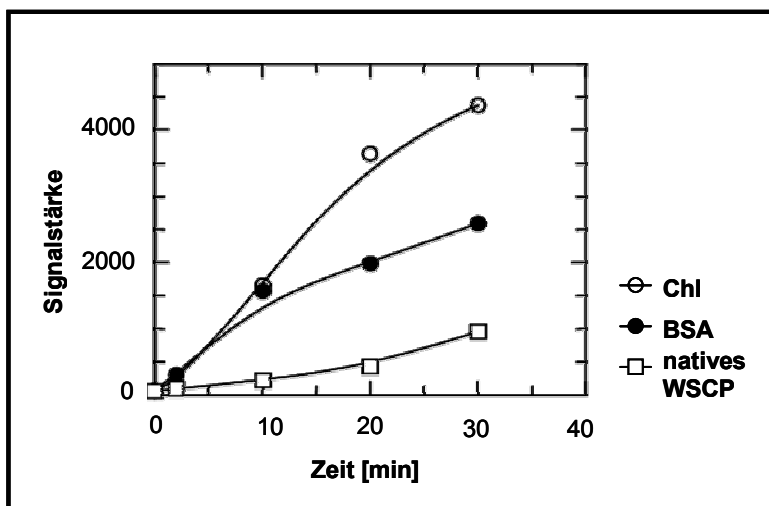


Abb. 3.20: Zeitabhängigkeit der Bildung von $^1\text{O}_2$. Die Bildung von $^1\text{O}_2$ wurde über die Synthese von TEMPO zeitabhängig gemessen (vgl. Abb. 3.19).

Zur weiteren Untersuchung der durch das WSCP gewährleisteten Schutzfunktion gegen die Bildung von $^1\text{O}_2$ wurde die Zeitabhängigkeit der Bildung des Nitroxylradikals TEMPO gemessen (Abb. 3.20). Wenn Chlorophyll an das WSCP gebunden vorlag, wurde auch nach 30-minütiger Belichtung die TEMPO-Bildung gegenüber freiem Chlorophyll um ca. 75% reduziert. Mit BSA als Proteinkomponente betrug dieser Wert nur ca. 50%. Bei Belichtung mit stärkeren Lichtintensitäten ($1000 \mu\text{mol} \cdot \text{e}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) wurde der Unterschied zwischen der BSA-Probe und dem WSCP geringer, was einen generell dominierenden Löscheffekt durch Proteine andeutet (nicht gezeigt).

3.1.9.3. Thermostabilität

Nachdem sich gezeigt hatte, dass das WSCP ein relativ photostabiles Protein ist, wurden außerdem Experimente zur Thermostabilität durchgeführt. Dazu wurde

WSCP-his durch Verdünnung aus GuHCl mit Chlorophyll a sowie mit Chlorophyll b rekonstituiert und wie auch der native Komplex über Dichtegradienten aufgereinigt. Nach Absaugen der Komplexbande wurde diese CD-spektroskopisch vermessen, wobei die Spektren bei 4°C und nach 20-minütiger Inkubation bei 80°C aufgenommen wurden (Abb. 3.21). Weder bei nativen (nicht gezeigt) noch bei rekonstituierten Komplexen ist ein signifikanter Unterschied zwischen den CD-Spektren bei 4°C und 80°C zu erkennen. Das für das WSCP charakteristische Spektrum bleibt nach Inkubation bei 80°C und auch nach 3 Minuten bei 100°C (Abb. 3.21 C) noch nahezu vollständig erhalten. Erst 5-minütiges Erhitzen auf 100°C nach Zugabe von 1% SDS denaturierte den Protein-Pigment-Komplex.

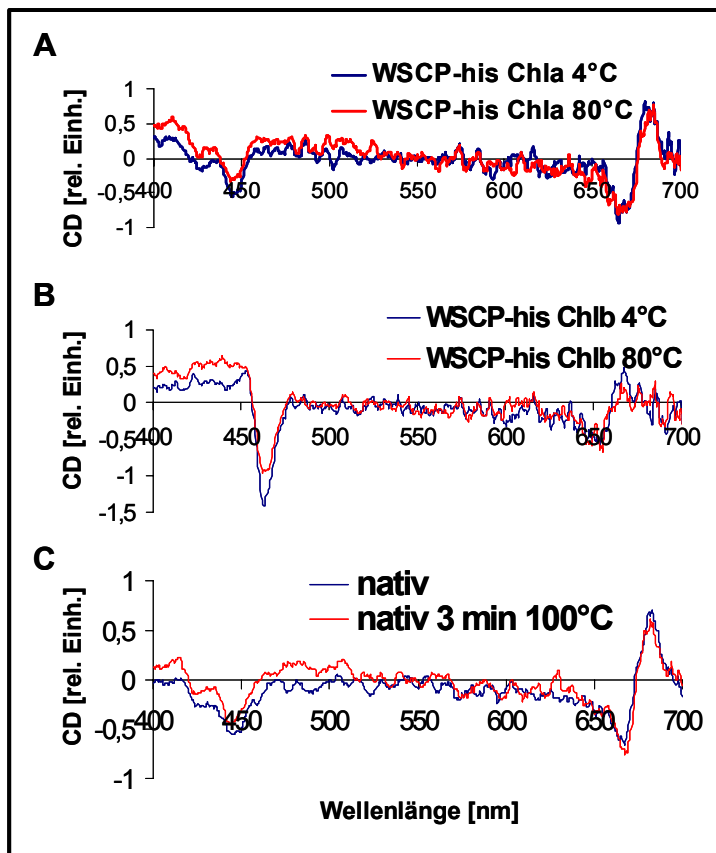


Abb. 3.21: Thermostabilität des nativen und des rekonstituierten WSCP. WSCP-his wurde aus GuHCl mit Chlorophyll a (A) und b (B) rekonstituiert (vgl. 3.3.9.4) und wie in 3.3.12 beschrieben über einen Saccharosedichtegradienten mit 0,1% LM aufgereinigt. CD-Spektren (vgl. 2.4.2) wurden bei 4°C und nach 20-minütiger Inkubation bei 80°C aufgenommen. Natives WSCP (C) wurde über einen detergensfreien Dichtegradienten aufgereinigt. Gezeigt sind CD-Spektren bei 4°C und nach 3-minütiger Inkubation bei 100°C.

Zusammenfassend kann man sagen, dass WSCP-his aufgrund seiner Ähnlichkeit zum nativen Protein in Bezug auf spektroskopische Eigenschaften sowie Pigmentbindung als geeignetes Werkzeug für Untersuchungen zur Funktion dieses chlorophyllbindenden Proteins genommen werden kann. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die pigmentinduzierte Multimerisierung des WSCP von der Anwesenheit des Phytolrestes abhängt. Es werden außerdem Chlorophyll-Vorstufen gebunden und das Protein zeigt Stabilität in Bezug auf Licht- und Hitzestress.

3.2. Versuche zur Pigmentbindung des PsbS-Proteins

Das PsbS-Protein gehört zur Familie der Chlorophyll a/b-bindenden Proteine (*Cab*-Proteine), unterscheidet sich jedoch von ihren typischen Vertretern durch eine mutmaßliche vierte Transmembrandomäne. Es tritt in etiolierten Pflanzen auf und scheint auch in Abwesenheit von Pigmenten stabil zu sein (Funk, 2001). Bezüglich der Funktion dieses Proteins wird daher eine Rolle als transient pigmentbindendes Protein bzw. als Chlorophyllcarrier diskutiert. Die Rekonstitution des PsbS mit Pigmenten könnte helfen, die pigmentbindenden Eigenschaften dieses Proteins zu untersuchen und davon ausgehend nähere Rückschlüsse auf seine Funktion zu ziehen.

3.2.1. Rekonstitution des PsbS-Proteins und Aufreinigung der pigmentierten Rekonstitutionsprodukte

Um zu untersuchen, ob das PsbS Protein *in vitro* mit Pigmenten in seinen nativen Zustand zurückgefaltet werden kann, wurden zunächst verschiedene Rekonstitutions- und Aufreinigungsmethoden getestet. Neben Rekonstitution mit Detergenswechsel, durch Verdünnung aus GuHCl und auf der Nickel-Säule wurde auch die Rekonstitution durch Verdünnung aus SDS verwendet (vgl. 2.3.10.3). Letztere stellte sich später als die geeignetste Methode heraus (nicht gezeigt).

Gleichzeitig sollte eine günstige Methode zur Aufreinigung möglicher PsbS-Rekonstitutionsprodukte etabliert werden. Dazu wurde zunächst eine sehr schwach denaturierende PAGE verwendet (Abb. 3.22). Das PsbS wurde mit Totalpigment durch Verdünnung aus SDS rekonstituiert und auf ein Deriphat-Gel aufgetragen. Als Positivkontrolle wurde unter gleichen Bedingungen rekonstituierter LHC II mitgeführt. Es ergab sich für PsbS unter schwach denaturierenden Bedingungen, (LDS-Gel, nicht gezeigt) wie auch im noch schonenderen Deriphat-Gel im Vergleich zum LHC II keine pigmentierte Bande. Die Analyse über eine schwach denaturierende oder eine Deriphat-PAGE erwies sich also als problematisch. Das Gelsystem bietet entweder zu harsche Bedingungen für die Auftrennung möglicher

Rekonstitutionsprodukte oder PsbS bindet keine Pigmente, es fände damit keine pigmentabhängige Rekonstitution statt.

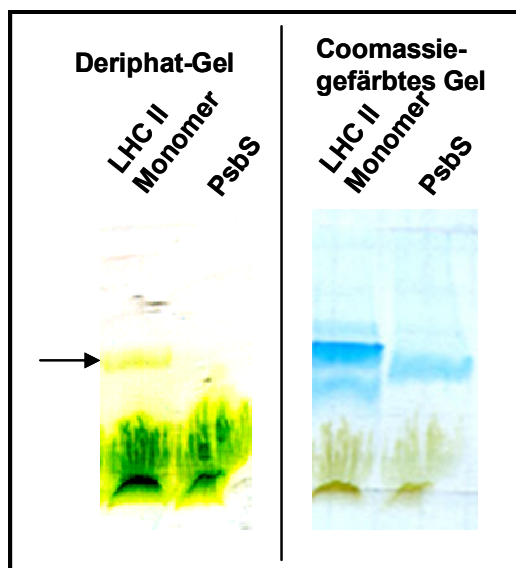


Abb 3.22: Rekonstitution von PsbS und LHCP im Vergleich. PsbS sowie LHCP (D7f.3) wurden durch Verdünnung aus SDS mit Totalpigment rekonstituiert (vgl. 2.3.10.3). Die Rekonstitutionsprodukte wurden über ein 15%-iges Deriphat-Gel aufgetrennt (vgl. 2.3.12). Der Pfeil zeigt die Lage der rekonstituierten LHC II-Monomere.

Um zu untersuchen, ob eine Aufreinigung eventueller Rekonstitutionsprodukte unter schonenderen Trennbedingungen und in anderem Detergens möglich wäre, wurden kontinuierliche Saccharosedichtegradienten mit zwei verschiedenen Puffersystemen getestet, außerdem das eingesetzte Pigment- zu Protein-Verhältnis optimiert. Als in die Rekonstitution eingesetztes Pigment wurde neben Totalextrakt auch mit Carotinoiden supplementiertes Totalpigment verwendet. Diese Pigmentmischung wurde so eingestellt, dass dem Totalextrakt (Chl a/b = 3:1) zusätzlich Gesamtcarotinoide (Lu/Nx/Vx/Car = 0,5/0,21/0,12/0,01; bezogen auf Chl a) zugeführt wurden. Im Rekonstitutionsansatz wurden dann pro Protein 10 Chlorophylle und 5 Carotinoide eingesetzt (der Carotinoidwert ist auf Lutein bezogen, die anderen Carotinoide sind in gleichem Verhältnis wie im Gesamtcarotinoidextrakt vorhanden). Im Folgenden wird diese Pigmentmischung als supplementiertes oder angereichertes Totalpigment bezeichnet. Die Auftrennung nach Rekonstitution mit angereichertem Totalpigment ergab neben freiem Pigment und Pigment-Aggregaten eine distinktere grün pigmentierte Bande, als das mit Totalpigment der Fall war (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde für folgende Versuche stets das supplementierte Totalpigment verwendet.

Bei den verwendeten Puffersystemen handelte es sich um Saccharose-Dichtegradienten mit Dodecylmaltosid (LM) als Detergens (0,4 M Saccharose,

0,1% LM), die entweder mit 5 mM Tricine pH 7,5 oder mit 5 mM Natriumphosphat pH 7,5 gepuffert waren. In Abbildung 3.23 ist das Ergebnis einer Rekonstitution durch Verdünnung aus SDS mit angereichertem Totalextrakt und anschließender Aufreinigung über Tricine-gepufferte Gradienten zu sehen. Man erkennt eine Abtrennung in freies Pigment und eine unterhalb laufende, pigmentierte Bande. Wie durch SDS-PAGE bestätigt werden konnte, enthält nach Rekonstitution die

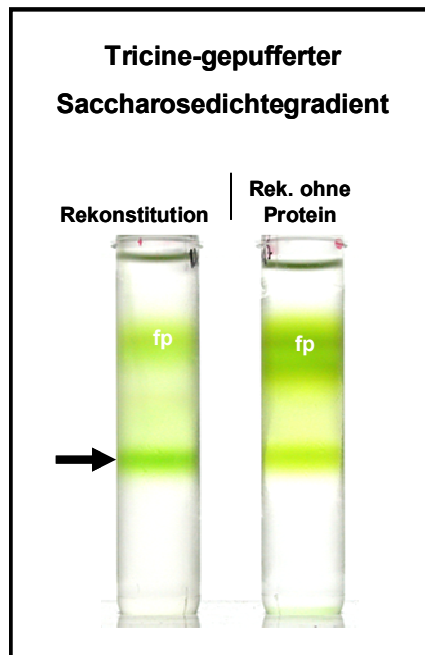


Abb 3.23: Auftrennung von rekonstituiertem PsbS im Tricine-gepufferten Saccharosedichtegradienten. PsbS wurde durch Verdünnung aus SDS mit angereichertem Totalpigment rekonstituiert (10 Chl a, 5 Lu/Protein; vgl. 2.3.10.3) und auf 0,4 M Sucrose-Gradienten (vgl. 2.3.13) mit 5 mM Tricine pH 7,5 und 0,1% LM aufgetragen. Gezeigt sind Gradienten nach Rekonstitution und mit und ohne Protein. fp, freies Pigment; a, Pigment-Aggregate; Pfeil, pigmentiertes PsbS.

pigmentierte Bande auf dieser Höhe das PsbS-Protein (nicht gezeigt). Allerdings ist im Gradienten nach Kontroll-Rekonstitution ohne Protein auf gleicher Höhe ebenfalls eine pigmentierte Bande zu erkennen. Das würde bedeuten, dass die Ausbildung der Bande im Rekonstitutionsgradienten evtl. nicht von der Anwesenheit des Proteins abhängt, sondern auf freies Pigment zurückzuführen ist. Mittels UVCD-Spektren konnte jedoch bestätigt werden, dass sich in dieser Bande Protein befindet, nicht aber in der darüberliegenden, die daher als freies Pigment bezeichnet werden kann. Ausgehend davon könnte die Bande im Kontrollgradienten auf eine unvollständige Abtrennung von freiem Pigment und eventuellen PsbS-Pigment-Komplexen im Gradienten mit der rekonstituierten Probe hindeuten. Ein Wechsel des Puffersystemes brachte eine Optimierung der Trennbedingungen.

Abbildung 3.24 zeigt PsbS, das mit angereichertem Totalpigment durch Verdünnung aus SDS rekonstituiert wurde sowie eine Negativkontrolle ohne Protein. Beides wurde über Saccharosegradienten, die mit Natriumphosphat

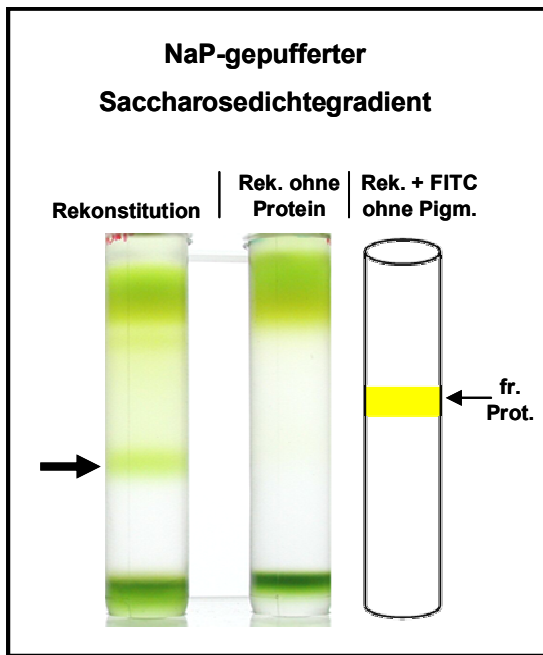


Abb 3.24: Auftrennung von rekonstituiertem PsbS im Natriumphosphatgepufferten Saccharosedichtegradienten.

PsbS wurde durch Verdünnung aus SDS (vgl. 2.3.10.3) mit angereichertem Totalpigment (10 Chl a, 5 Lu/Protein) rekonstituiert und auf 0,4 M Saccharosegradienten mit 5 mM NaP pH 7,4 und 0,1% LM aufgetragen (vgl. 2.3.13). Das Rekonstitutionsprodukt trennt sich in freies Pigment, pigmentiertes PsbS und Pigment-Aggregate. **fp**, freies Pigment; **a**, Pigment-Aggregate; **Pfeil**, pigmentiertes PsbS; **fr. Prot.**, freies Protein; **FITC**, Fluoreszenzfarbstoff, vgl. 2.3.11.

gepuffert waren, aufgetrennt. Es ist eine optimierte Trennung der Rekonstitutionsprodukte in freies Pigment, Pigmentaggregate und eine dazwischen laufende, distinkte grüne Bande zu erkennen, die das PsbS enthält (vgl. dazu SDS-PAGE in Abb. 3.25). Der Gradient nach Rekonstitution ohne Protein zeigt auf dieser Höhe keine Bande. Das Ergebnis der Kolo-kalisation von PsbS und Pigment in derselben Bande veranlasst zu der Vermutung, dass es sich hier um pigmentiertes Protein handeln könnte. Um auszuschließen, dass die Kolo-kalisation eine zufällige Erscheinung von freiem Pigment und freiem Protein auf gleicher Höhe ist, wurde PsbS mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC markiert (vgl. 2 III.10) und anschließend mit angereichertem Totalpigment sowie als Negativkontrolle ohne Pigmente rekonstituiert. Die Rekonstitutionsansätze wurden über Saccharosegradienten aufgereinigt. Anschließend ließ sich der Farbstoff unter der UV-Lampe anregen. Über die Farbstofffluoreszenz konnte die Lage des freien Proteins im Gradienten visualisiert werden. Aus diesem Experiment ergab sich die Lokalisation des freien Proteins in einer Bande, die zwischen dem freien Pigment und der pigmentierten PsbS-Bande läuft (vgl. Abb 3.24).

Damit konnte nun die Vermutung bekräftigt werden, dass es sich bei der pigmentierten Bande im Dichtegradienten nicht um Kolo-kalisation, sondern um pigmentiertes PsbS handeln könnte.

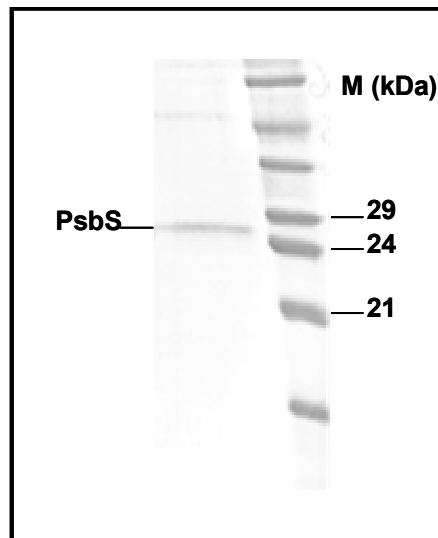
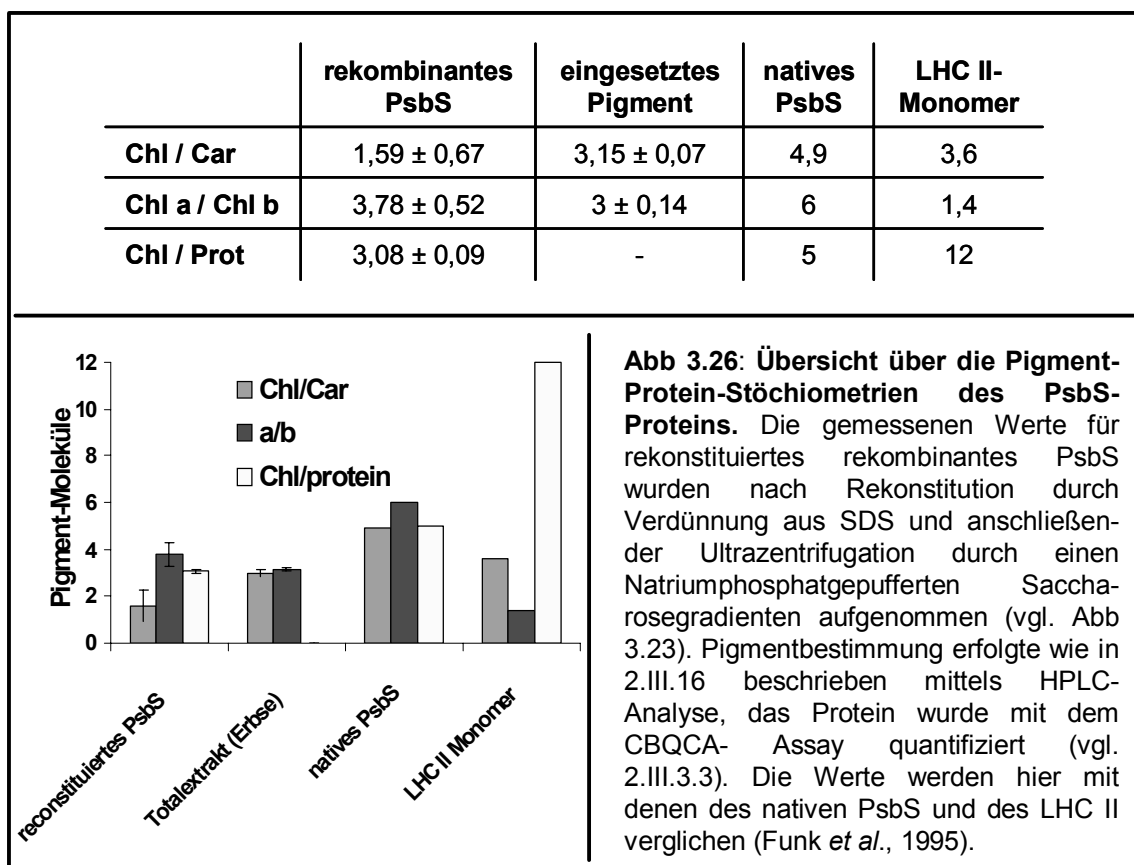


Abb. 3.25: Identifikation des PsbS-Proteins in einer Gradientenbande. PsbS wurde mit supplementiertem Totalextrakt rekonstituiert (vgl. 2.3.10.3) und über einen Saccharosedichtegradienten aufgereinigt (vgl. 2.3.13). Ein Aliquot der pigmentierten PsbS Bande wurde auf ein 15%-iges denaturierendes PAA Gel aufgetragen. M: Marker

3.2.2. Pigment-Stöchiometrien

Zur näheren Charakterisierung der pigmentierten PsbS-Bande wurden die Pigmente mit 2-Butanol extrahiert und mittels HPLC-Analyse quantifiziert (vgl. 2.3.15, 16). Die Proteinmenge wurde über den CBQCA-Assay bestimmt (vgl. 2.3.3.3). Die molaren Stöchiometrien sind in Abbildung 3.26 zusammengefasst. Mit



angereichertem Totalextrakt rekonstituiertes PsbS zeigt im Vergleich zu dem Pigmentgemisch, welches in die Rekonstitution eingesetzt worden war, einen Unterschied im Chlorophyll- zu Carotinoid- sowie im Chlorophyll a/b-Verhältnis. Das Chlorophyll- zu Carotinoidverhältnis beispielsweise ist im rekonstituierten PsbS mit ca. 1,59 geringer, als das der eingesetzten Pigmentmischung mit 3,15. Das rekombinante PsbS scheint also Carotinoide zu akkumulieren. In der Tabelle sind die Werte des rekonstituierten PsbS außerdem vergleichend mit den Literaturwerten des nativen PsbS dargestellt. Das rekonstituierte Protein bindet ca. 3 Chlorophylle, während im nativen PsbS 5 detektiert wurden (Funk *et al.*, 1995). Das Chlorophyll a/b-Verhältnis ist im nativen Protein höher als im rekonstituierten, der größte Unterschied zwischen nativem und rekombinantem PsbS zeigt sich jedoch im Chlorophyll- zu Carotinoidverhältnis; es werden im rekonstituierten PsbS deutlich mehr Carotinoide pro Molekül Chlorophyll detektiert, als im nativen. An das rekonstituierte Protein binden außerdem mit 1,1–3,2 deutlich mehr Carotinoide pro Protein, als an das native Protein mit 1 (nicht gezeigt); diese Werte schwanken jedoch stark, worauf später noch näher eingegangen werden soll. Aus dem Vergleich mit dem rekonstituierten LHC II-Monomer wird ersichtlich, dass das PsbS mit ca. 3 Chlorophyllen pro Protein deutlich weniger bindet, als das LHC II-Monomer mit 12.

Die Ergebnisse zeigen, dass Chlorophyll a und b in einem möglichen PsbS-Komplex angelagert werden, davon wird Chlorophyll a deutlich bevorzugt. Des Weiteren findet man im rekombinanten PsbS-Komplex mehr Carotinoide pro Chlorophyll akkumuliert, als im eingesetzten Pigment angeboten wurde.

3.2.3. Spektroskopische Eigenschaften des rekonstituierten PsbS Proteins

Um mehr Informationen über die Pigmentbindung zu erhalten, wurde rekonstituiertes PsbS über Saccharosegradienten aufgereinigt und mit verschiedenen spektroskopischen Methoden vermessen. Mit Absorptionsspektren beispielsweise kann festgestellt werden, ob sich die in die Rekonstitution eingesetzte Pigmentmischung von der in der pigmentierten PsbS-Bande unterscheidet. In der Absorption bei RT sind zwischen rekonstituiertem,

aufgereinigtem PsbS und dem in die Rekonstitution eingesetzten Pigment leichte Unterschiede zu erkennen (nicht gezeigt). Eine deutlichere Bänderung im Carotinoid-Bereich zeigt eine stärkere Anreicherung von Carotinoiden. Vergleicht man jedoch die Absorptionsspektren von rekonstituiertem, aufgereinigtem PsbS und den im Komplex, also am Protein gefundenen Pigmenten, sind keine signifikanten Unterschiede zu erkennen (Claudia Büchel, pers. Mitteilung). Um verschiedene Chlorophyll-Spezies am rekonstituierten Protein detektieren zu können, wurden Absorptionsspektren bei 77K aufgenommen (nicht gezeigt). Unterschiedliche Chlorophyll-Absorptionsformen würden sich durch verschobene Maxima auszeichnen, die dann durch Bildung der Ableitung erkennbar gemacht werden können. In der Pigmentkontrolle war ein Minimum bei 672 nm zu sehen, die rekonstituierte Probe wies eine zusätzliche Schulter bei 670 nm auf. Dieses Ergebnis ließ auf eine zusätzliche Chlorophyll-Absorptionsform in Zusammenhang mit einer möglichen Assoziation mit dem Protein schließen, es konnte jedoch nur in ca. 50% der Fälle reproduziert werden.

Mit CD-Spektroskopie lassen sich Aussagen über die Ausrichtung der Chromophore in einem Protein-Pigment Komplex, sowie ihre Kopplung untereinander treffen. Rekonstituiertes und aufgereinigtes PsbS wurde CD-spektroskopisch sowohl im sichtbaren Bereich als auch im UV vermessen (vgl. 2.4.2) und mit Rekonstitutionen ohne Protein (VIS) bzw. ohne Pigment (UV) als Negativkontrollen verglichen. Im Sichtbaren unterschied sich das Spektrum des rekonstituierten PsbS nicht von der Kontrolle ohne Protein. Zum Vergleich wurde ein für das LHC II-Monomer typisches Spektrum mit dargestellt (vgl. Abb. 3.27). Für

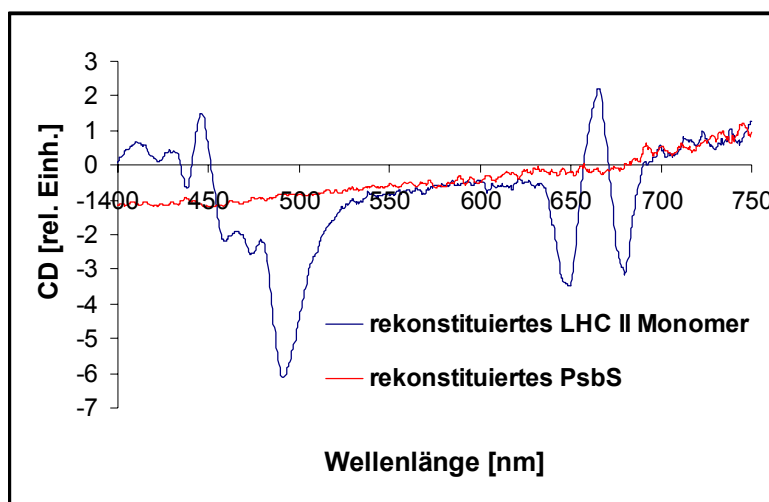


Abb. 3.27: CD-Spektren von denaturiertem und rekonstituiertem PsbS. A) PsbS wurde durch Verdünnung aus SDS mit supplementiertem Totalpigment, LHCP mit Totalextrakt rekonstituiert (vgl. 2.3.10.3). Die Rekonstitutionsprodukte wurden über Dichtegradienten aufgereinigt. CD-Spektren wurden im sichtbaren Bereich aufgenommen

das PsbS konnte kein CD-Signal und somit keine excitonische Kopplung der Pigmente festgestellt werden.

Im UV-Bereich werden CD-Signale gemessen, die durch unterschiedliche Konformationen des Proteins hervorgerufen werden. Hier verhielt sich die rekonstituierte Probe jedoch unterschiedlich zur Kontrolle ohne Pigment, sowie zum denaturierten Protein (vgl. Abb. 3.28). Das UVCD-Spektrum des rekonstituierten Proteins weist Minima bei 210 und 220 nm auf, wie sie für eine alpha-Helix charakteristisch sind. Diese sind bei der Rekonstitution ohne Pigmente und bei dem denaturierten Protein weniger stark ausgeprägt, so dass hier nicht mehr von charakteristischen alpha-Helix-Spektren gesprochen werden kann. Das rekonstituierte Protein weist also einen größeren helikalen Anteil auf, als das denaturierte Protein und die Kontrolle. Diese Tendenzen wurden durch vergleichende Protein-CD-Messungen von denaturiertem und mit Detergenswechsel rekonstituiertem (vgl. 2.3.10.1) PsbS gestützt (Claudia Büchel, pers. Mitteilung). Der höhere helikale Anteil nach Rekonstitution mit Pigmenten könnte auf eine pigmentabhängige Faltung des Proteins hindeuten.

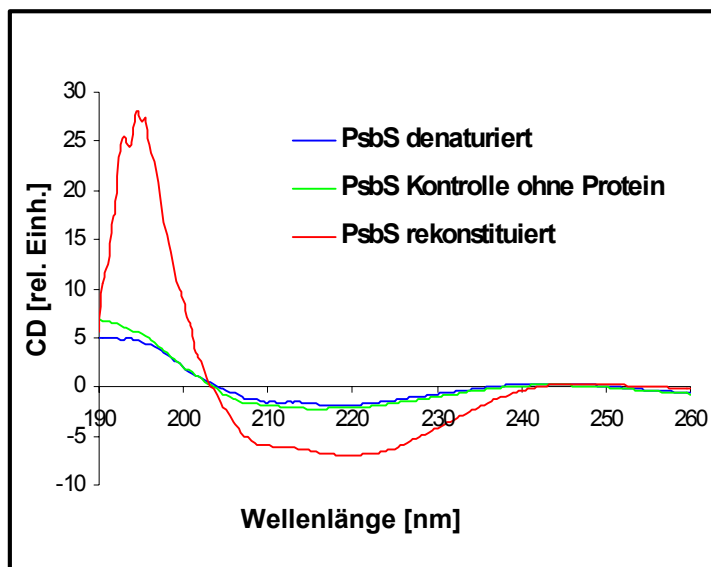


Abb. 3.28: UV-CD-Spektren von denaturiertem und rekonstituiertem PsbS. PsbS wurde durch Verdünnung aus SDS mit supplementiertem Totalpigment (-) sowie ohne Pigment (-) rekonstituiert (vgl. 2.3.10.3) und über Dichtegradienten aufgereinigt. CD-Spektren wurden aufgenommen und nach Abzug der entsprechenden Kontrollspektren (Puffer ohne Protein und Pigment) gegeneinander aufgetragen. Die Spektren wurden mit denaturiertem PsbS (-) verglichen

Aus fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen können Informationen über die funktionelle Kopplung von Pigmenten und den Energietransfer von einem Pigment auf ein anderes erhalten werden. Von aufgereinigtem, rekonstituiertem PsbS wurden sowohl nach Anregung von Chlorophyll a bei 410 nm als auch von Chlorophyll b bei 470 nm Fluoreszenzemissionsspektren aufgenommen (nicht

gezeigt). Es war jedoch weder ein Unterschied zur Pigmentkontrolle noch ein Energietransfer von Chlorophyll b nach Chlorophyll a zu erkennen.

Ein Energietransfer zwischen möglicherweise an das PsbS gebundenen Pigmenten könnte einerseits nicht vorhanden, andererseits aber in diesem System nicht detektierbar sein. Ein Grund für Letzteres könnte eine zu große räumliche Entfernung zwischen den Chromophoren sein. Um diesen Punkt zu überprüfen, wurde PsbS N-terminal mit dem Fluoreszenzfarbstoff TRITC markiert (vgl. 2.3.11), rekonstituiert und aufgereinigt. Es sollte getestet werden, ob der Farbstoff in eine

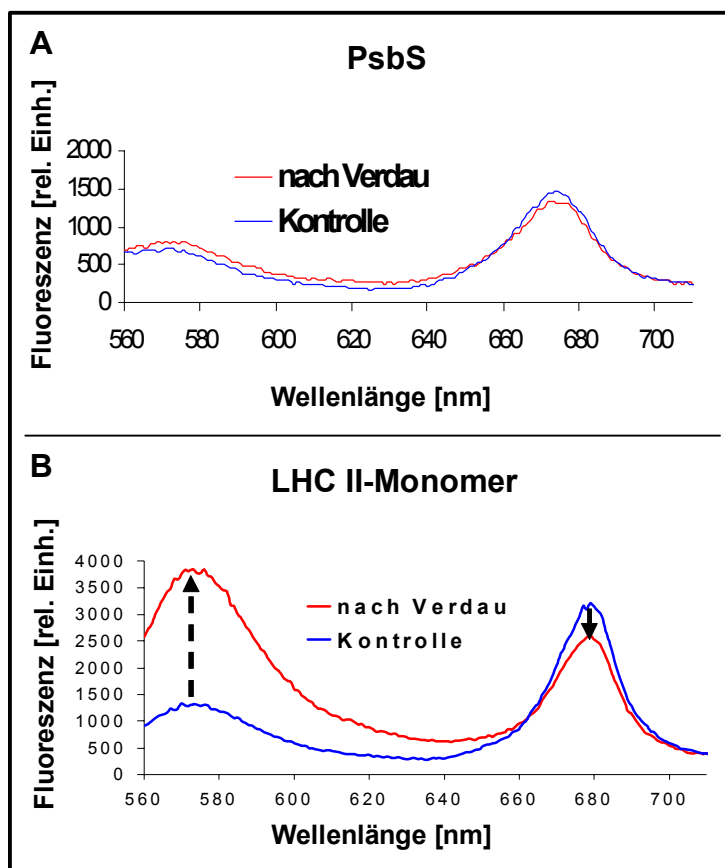


Abb. 3.29: Fluoreszenz-emissionsspektren von TRITC-markiertem rekonstituiertem PsbS im Vergleich mit dem LHC II-Monomer. TRITC-markiertes PsbS und LHC II (Lhcb1) wurden durch Verdünnung aus SDS mit Totalpigment (LHC II) bzw. supplementiertem Totalpigment (PsbS) rekonstituiert (vgl. 2.3.10.3) und über Saccharosedichte gradienten aufgereinigt (vgl. 2.3.13). Fluoreszenzemissionsspektren wurden nach Anregung des Farbstoffes bei 548 nm aufgenommen. Gezeigt sind Spektren nach Trypsinverdau (rot) und die unverdaute Kontrolle (blau).

ausreichende räumliche Nähe zu einem Chromophor gelangt, so dass Energietransfer von TRITC auf Chlorophyll a stattfinden kann. Dazu wurde das Rekonstitutionsprodukt im Absorptionsmaximum des Farbstoffes (für TRITC 548 nm) angeregt und die Fluoreszenzemission im roten Spektralbereich detektiert. Als Kontrolle dafür, dass der Energietransfer proteinspezifisch ist, dient ein Trypsin-Verdau. Findet ein Energietransfer vom Farbstoff auf Chlorophyll a statt, würde nach dem Entfernen des N-terminal gebundenen Farbstoffes einerseits die Farbstofffluoreszenz ansteigen, andererseits jedoch die Chlorophyllfluoreszenz abnehmen. Abbildung 3.29 zeigt Fluoreszenzemissionsspektren von TRITC-

markiertem PsbS, sowie von LHC II-Monomeren als Positivkontrolle. Für das rekonstituierte PsbS (A) ist zwischen der verdauten und der nicht verdauten Probe kein Unterschied zu erkennen. Für das rekonstituierte LHC II-Monomer (B) jedoch sieht man nach dem Trypsinverdau einen deutlichen Anstieg der Farbstofffluoreszenz (gestrichelter Pfeil). Auch ein Abfall der Chlorophyllfluoreszenz ist erkennbar (durchgezogener Pfeil).

Die Ergebnisse der spektroskopischen Messungen deuten darauf hin, dass in einem möglichen rekonstituierten PsbS Komplex die Pigmente weder so zueinander ausgerichtet sind, dass sie excitonische Wechselwirkungen eingehen können, noch dass ein Energietransfer zwischen ihnen stattfinden kann. Diese Vermutung schließt jedoch eine schwache oder transiente Kopplung von Pigment und Protein nicht aus. Des Weiteren könnten Pigmente auch sterisch so gebunden sein, dass ein Energietransfer nicht möglich ist oder nicht stattfindet.

3.2.4. Rekonstitution mit variierendem Pigmentangebot

3.2.4.1. Sind Carotinoide essentiell für die Rekonstitution des PsbS-Proteins?

Trotz der berechneten Pigment-Stöchiometrien blieben bezüglich der Pigmentbindung noch viele Fragen offen, beispielsweise ob ein bestimmtes Pigment evtl. essentiell für die Rekonstitution ist. Außerdem sollte mit weiteren Versuchen mit variierender Carotinoidart und -menge mehr Konstanz in die Ergebnisse bezüglich der Carotinoidwerte gebracht werden.

Um zu testen, ob Chlorophylle oder Carotinoide essentielle Pigmente für die Rekonstitution des PsbS darstellen, wurden Rekonstitutionsexperimente mit angereichertem Totalpigment, sowie isolierten Chlorophyllen ($a/b = 3:1$) und isolierten Carotinoiden ($Lu/Nx/Vx/Car = 0,5/0,21/0,12/0,01$ bezogen auf Chl a) durchgeführt. Die Rekonstitutionsprodukte wurden mittels eines Gradienten aufgereinigt (Abb. 3.30). Die Gradienten nach Rekonstitution mit Totalpigment zeigten - wie zuvor erwähnt - eine Auftrennung in ungebundenes Pigment, eine Aggregatbande und eine pigmentierte PsbS Bande, die im Kontroll-Gradienten

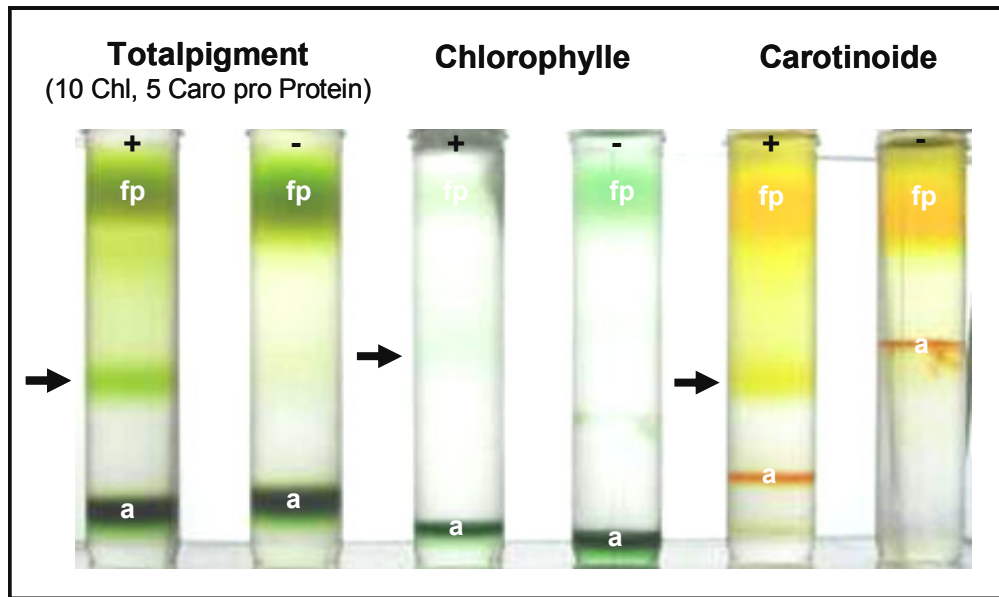


Abb 3.30: PsbS-Rekonstitution mit Xanthophyll-supplementiertem Totalpigment, Chlorophyllen und Xanthophyllen. PsbS wurde nach Rekonstitution durch Verdünnung aus SDS (vgl. 2.3.10.3) mit supplementiertem Totalpigment (10 Chl, 5 Xan pro Protein), aufgereinigtem Gesamtchlorophyll (10 Chl/Protein) und aufgereinigten Gesamtcarotinoiden (5 Luteine/Protein) auf 0,4 M Saccharosegradienten mit 0,1% LM aufgetragen (vgl. 2.3.13). Das Rekonstitutionsprodukt trennt sich in freies Pigment (fp), Pigment-Aggregate (a) und pigmentiertes PsbS (Pfeil). +, Rekonstitution; -, Negativkontrolle ohne Protein; Chl, Chlorophyll; Caro, Carotinoide.

ohne Protein nicht zu sehen ist. Nach Rekonstitution mit Carotinoiden sieht das Ergebnis ähnlich aus, auch hier trennen sich freies Pigment und Carotinoidaggregate von einer pigmentierten, PsbS enthaltenden Bande ab. Im Kontroll-Gradienten befindet sich auf dieser Höhe keine Bande, die Aggregatbande läuft allerdings weitaus höher als im Rekonstitutionsgradienten. Daraus lässt sich schließen, dass in letzterem in der Aggregatbande auch Protein akkumuliert sein könnte. Nach Rekonstitution mit aufgereinigten Chlorophyllen ergibt sich ein verändertes Bild im Gradienten. Hier trennt sich die Probe zwar auch in ungebundenes Pigment und Pigmentaggregate auf, die durch einen Pfeil gekennzeichnete pigmentierte PsbS-Bande ist jedoch deutlich schwächer, als sie es nach Rekonstitution mit Totalpigment bzw. Carotinoiden ist. Rekonstitutionsversuche mit aufgereinigtem Chlorophyll und steigender Carotinoidkonzentration ergaben mit zunehmender Carotinoidkonzentration ebenfalls eine stärkere Intensität und Schärfe der PsbS enthaltenden Bande (Abb. 3.31). Auch hier ist zu beobachten, dass mit Chlorophyllen als einzigen in die Rekonstitution eingesetzten Pigmenten nahezu keine distinkte und eindeutige Bande auf der Höhe des pigmentierten PsbS detektiert werden konnte. Des Weiteren liegt die

Aggregatbande nach PsbS-Rekonstitution mit der höchsten Xanthophyllmenge wieder tiefer ohne Protein im Rekonstitutionsansatz.

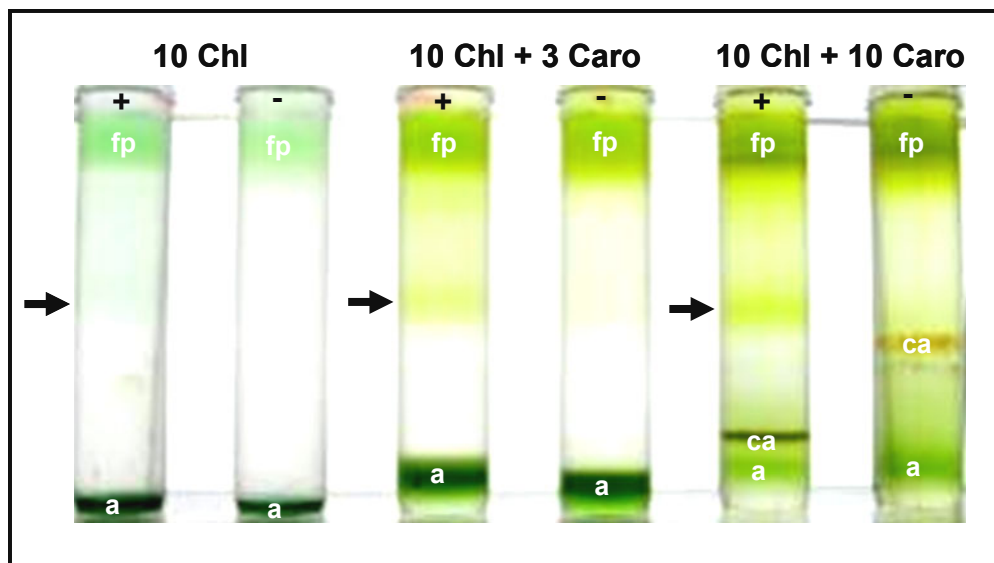


Abb. 3.31: PsbS Rekonstitution mit steigendem Carotinoid-Angebot. PsbS wurde nach Rekonstitution durch Verdünnung aus SDS mit Chlorophyll a allein (10 Chl a/Protein), sowie mit steigender Carotinoidmenge (10 Chl a und 3 bzw. 10 Carotinoide - bezogen auf Lu) rekonstituiert (vgl. 2.3.10.3). Die Rekonstitutionsprodukte wurden auf 0,4 M Saccharosegradienten mit 0,1% LM aufgetragen (vgl. 2.3.13). +, Rekonstitution; -, Negativkontrolle ohne Protein; a, Pigment-Aggregate; ca, Carotinoid-Aggregate; Chl, Chlorophyll; Caro, Carotinoide; fp, freies Pigment; Pfeil, pigmentiertes PsbS.

Die Pigment-Stöchiometrien der PsbS enthaltenden Gradientenbanden zeigen für die Rekonstitution mit angereichertem Totalextrakt im Vergleich mit dem eingesetzten Pigment keinen großen Unterschied für das Chlorophyll zu Carotinoid Verhältnis (nicht gezeigt). Betrachtet man jedoch das Chlorophyll a/b-Verhältnis, sowie das Verhältnis der Carotinoide untereinander, so lässt sich feststellen, dass in der PsbS enthaltenden Bande tendentiell mehr Chlorophyll a als b akkumuliert wird. Die Pigment-Stöchiometrien der transparenten PsbS Bande nach Rekonstitution mit aufgereinigten Chlorophyllen zeigen neben geringen Unterschieden im Chlorophyll a/b-Verhältnis ein interessantes Phänomen: es konnten geringe Mengen an β -Carotin nachgewiesen werden (β -Carotin / Chl a = 0,04). Im eingesetzten Pigment waren mit HPLC-Analyse keine Carotinoide nachweisbar. Das würde bedeuten, dass sich dennoch substöchiometrische Mengen an β -Carotin in der Pigmentmischung befunden haben müssen, die sich dann aber in der PsbS enthaltenden Bande angereichert haben.

Diese Ergebnisse deuten an, dass eventuell Carotinoide die für die Rekonstitution des PsbS Proteins essentiellen Pigmente darstellen und Chlorophylle eher in Gegenwart von Carotinoiden gebunden werden. Über die Spezifität der Chlorophyllbindung in der schwachen Bande nach Rekonstitution mit Gesamtchlorophyll kann keine Aussage gemacht werden.

3.2.4.2. Wird ein bestimmtes Pigment bevorzugt akkumuliert?

Um der Frage nachzugehen, ob eines der im angereicherten Totalpigment vorhandenen Pigmente vom PsbS bevorzugt akkumuliert wird und somit eventuell in der Rekonstitution bisher den limitierenden Faktor darstellte, wurde das Protein mit Pigmentmischungen rekonstituiert, die von Chlorophyll a und einem anderen oder aber allen im Totalextrakt der Erbse vorhandenen Pigmenten (Chl a, Chl b, Nx, Vx, Lu) 10 Moleküle pro eingesetztem PsbS enthielten. Die Pigmentmischungen wurden hergestellt, indem Totalpigment durch Zugabe von beispielsweise Violaxanthin so eingestellt wurde, dass 10 Chlorophyll a und 10 Violaxanthin pro PsbS-Molekül in die Rekonstitution eingesetzt wurden (im

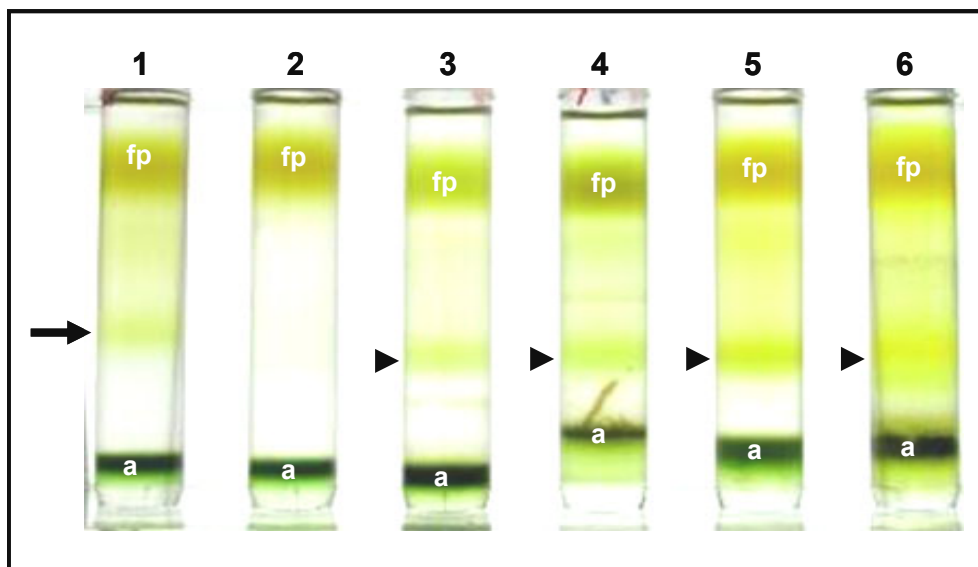


Abb 3.32: PsbS-Rekonstitution mit variierendem Pigment-Angebot („10 x“). PsbS wurde nach Rekonstitution durch Verdünnung aus SDS mit supplementiertem Totalpigment rekonstituiert (vgl. 2.3.9.3). 1: Supplementierter Totalextrakt; 10 Chl/ Prot, 5 Xan(Lu)/Prot, 2: Mock ohne Protein. In den folgenden Pigmentmischungen ist immer Totalpigment zugrundegelegt, einzelne Komponenten wurden erhöht. 3: 10 Chl b/ Prot, 4: 10 Vx/ Prot, 5: 10 Lu/ Prot, 6: je 10 Nx, Vx, Lu, Chl a, Chl b, Car/ Prot. Die Rekonstitutionsprodukte wurden auf 0,4 M Sucrose - Gradienten mit 0,1% LM aufgetragen (vgl. 2.3.12). fp, freies Pigment; a, Pigment - Aggregate; Pfeil, pigmentiertes PsbS.

Folgenden als „TE 10 X“ bezeichnet). Die Pigmentmischung, in der 10 Moleküle von jedem Pigment pro Protein eingesetzt wurde, wird im Folgenden als „10 all“ bezeichnet.

Die Rekonstitutionsprodukte wurden über Dichtegradienten aufgereinigt (Abb. 3.32). Spur 1 bezeichnet einen Gradienten nach Rekonstitution mit supplementiertem Totalextrakt, Spur 2 die Kontroll-Rekonstitution ohne Protein. Wie schon zuvor beschrieben, findet man das PsbS-Protein in einer pigmentierten Bande, die etwa in der Mitte des Gradienten, nicht aber im Kontroll-Gradienten zu sehen ist. Die anderen Gradienten, in denen das supplementierte Pigment Chlorophyll b (3), Violaxanthin (4), Lutein (5) oder „10 all“ (6) ist, zeigen diesbezüglich das gleiche Erscheinungsbild. Eine Ausnahme stellt der Gradient Nr. 4 dar, in dem sich zusätzlich Luteinaggregate als orangefarbener Bereich abzeichnen. Die spektroskopische Analyse der Gradientenbanden bestätigte u.a. die Ergebnisse aus den vorherigen CD-Messungen: es konnten keine excitonischen Wechselwirkungen zwischen Pigmenten oder Pigment und Protein festgestellt werden (nicht gezeigt).

Es gibt keinen Hinweis auf Energietransfer; Fluoreszenz- und Absorptionsmessungen deuten jedoch Unterschiede zwischen eingesetztem und mit dem PsbS assoziiertem Pigment an (nicht gezeigt). Die Stöchiometrien bestärken diese Annahme (Tab. 3.2 und 3.3). Die Unterschiede von pigmentierter PsbS-Bande zu

	TE 10 Caro einges.	TE 10 Caro am PsbS	TE 10 b einges.	TE 10 b am PsbS	TE 10 V einges.	TE 10 V am PsbS	TE 10 L einges.	TE 10 L am Psbs
Chl/Car	5,99	0,91	9,35	0,92	0,65	0,56	1,85	0,56
Chl a/b	3,02	3,44	0,72	1,01	1,66	1,84	3,06	3,1
Nx/Chl a	0,028	0,136	0,033	0,329	0,071	0,11	0,035	0,137
Vx/Chl a	0,031	0,11	0,029	0,272	2,042	2,082	0,031	0,102
Lu/Chl a	0,135	0,751	0,130	1,119	0,25	0,442	0,59	1,966
β -Car/Chl a	0,029	0,424	0,063	0,419	0,122	0,13	0,062	0,146

Tab 3.2: Molare Pigment-Stöchiometrien für das PsbS-Protein nach Rekonstitution mit variierendem Pigmentangebot („TE 10 X“). PsbS wurde durch Verdünnung aus SDS mit supplementiertem Totalpigment rekonstituiert (vgl. 2.3.10.3) und über Saccharosedichtegradienten aufgereinigt (vgl. 2.3.13). Pigmentquantifizierung erfolgte mittels HPLC Analyse (vgl. 2.3.16), Proteinbestimmung nach dem CBQCA-Assay (2.3.3.3). b, Chlorophyll b; Caro, Carotinoide; einges., eingesetzte Pigmentmischung; L, Lutein; Prot, Protein; TE, Totalextrakt; V, Violaxanthin. Farblich hinterlegt sind signifikante Unterschiede im Pigmentgehalt am PsbS im Vergleich zum eingesetzten Pigment.

eingesetztem Pigment bestehen im Wesentlichen darin, dass in der PsbS-Bande mehr Carotinoide pro Chlorophyll akkumuliert werden, als in der eingesetzten Pigmentmischung. Diese Tendenz zieht sich durch alle untersuchten Banden. Die Stöchiometrien des sechsten Gradienten wurden wegen unzureichender Auftrennung nicht erwähnt. β -Carotin wird in allen untersuchten Gradienten angereichert, allerdings variiert der Faktor stark je nach eingesetztem Pigment. Im Gradienten mit 10 Carotinoiden (TE 10 Caro) beträgt der Faktor 8,3, nach Rekonstitution mit 10 Chlorophyll b (TE 10 b) 6,7, nach Rekonstitution mit 10 Violaxanthin (TE 10 V) 1,1 und mit 10 Lutein (TE 10 L) 2,4.

Betrachtet man zusätzlich die Pigment zu Protein-Verhältnisse (Tab. 3.3), so wird zunächst deutlich, dass in einem möglichen PsbS Komplex mehr Chlorophyll a als b gebunden ist. Bezüglich der Carotinoideakkumulation lässt sich sagen, dass Carotinoide generell bevorzugt werden. Darunter könnten die hydrophileren Xanthophylle Lutein und Neoxanthin eventuell eine bevorzugte Rolle spielen. In der Protein-Pigment-Stöchiometrie fällt auf, und dieses Ergebnis ist für alle untersuchten Banden konstant, dass genau ein β -Carotin pro PsbS detektiert werden konnte. β -Carotin ist neben Lutein das am stärksten vertretene Carotinoide in einem möglichen PsbS-Komplex.

	TE 10 Caro	TE 10 b	TE 10 V	TE 10 L
Nx/Prot	0,31	0,79	0,85	0,93
Vx/Prot	0,23	0,65	16,1	0,69
Lu/Prot	1,7	2,68	3,41	13,4
β-Car/Prot	0,96	1	1	1
Chl b/Prot	0,66	2,37	4,18	2,2
Chl a/Prot	2,25	2,39	7,72	6,82

Tab 3.3: Molare Pigment-Protein-Stöchiometrien für das PsbS-Protein nach Rekonstitution mit variierendem Pigmentangebot („TE 10 X“). Protein- und Pigmentquantifizierung erfolgte wie in Tab. 3.2 beschrieben. TE, Totalextrakt; Caro, Carotinoide; b, Chlorophyll b; V, Violaxanthin; L, Lutein; Prot, Protein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass kein eindeutiger Beweis für die Rekonstitution des PsbS Proteins gefunden werden konnte. Die reproduzierbare Tendenz der Akkumulation von Chlorophyll a und Carotinoiden in der PsbS-Bande könnte jedoch ein Hinweis auf die mögliche transiente Pigmentbindung dieses Proteins *in vitro* sein.

3.3. Isolation von pigmentierten „small Cab-like proteins“ aus cyanobakteriellen Thylakoiden und Versuche zur Pigmentierung *in vitro*.

Scp's, die „small Cab-like proteins“, sind in der Thylakoidmembran von *Synechocystis* PCC 6803 lokalisiert und gehören zu einer Multigenfamilie (Funk und Vermaas, 1999). Die durch Starklicht induzierten Proteinprodukte dieser Genfamilie, ScpA-E, weisen Homologien zu konservierten Bereichen der Cab-Proteine auf. Für sie wird eine Funktion als transiente Pigment-Carrier vermutet. Mit präparativer Isoelektrischer Fokussierung können solubilisierete Thylakoide von *Synechocystis* aufgetrennt werden (Funk, pers. Kommentar). In einem anschließenden Western Blot lassen sich ScpC und D in einer pigmentierten Bande immunologisch nachweisen (Hao *et al.*, 2001). Der Nachweis erfolgt über einen spezifischen Antikörper gegen die N-Termini beider Proteine (Funk & Vermaas, 1999). Dieser Antikörper ist für beide Proteine spezifisch, da ScpC und D sich auf Proteinebene sehr ähnlich sind. In Abbildung 3.3 ist ein Vergleich der Aminosäuresequenz beider Proteine gezeigt, darin sind nicht übereinstimmende Aminosäuren rot dargestellt. Aufgrund der großen Homologie kann mittels Western Blot keine eindeutige Identifizierung vorgenommen werden. Auch die Isoelektrischen Punkte beider Proteine unterscheiden sich nur wenig voneinander, der von ScpC beträgt 5,54, der des ScpD 4,86 (EMBL, siehe Anhang). Beide Proteine sollten in der Thylakoidmembran von Cyanobakterien nachgewiesen, isoliert und im Bezug auf ihre Pigmentbindung analysiert werden. Mit Hilfe der daraus gewonnenen Informationen sollte dann überexprimiertes rekombinantes ScpC und ScpD rekonstituiert werden.

ScpD	MT	SRGFRLDQ	DNRLNNFAIE	PVYVDSSVQ	AGWTEYAEKM
ScpC	MT	TRGFRLDQ	DNRLNNFAIE	PEVYVDSSVQ	AGWTKYAEKM
ScpD		NGRFAMIGFV	SLLAMEVITG	HGIVGWLNSL	
ScpC		NGRFAMIGFA	SLLIMEVVTG	HGVIIGWLNSL	

Abb. 3.33: Sequenzvergleich von ScpC und D. Nicht übereinstimmende Aminosäuren sind farbig dargestellt. Nach Funk & Vermaas, 1999.

3.3.1. Auftrennung von solubilisierten *Synechocystis*-Thylakoiden mittels IEF

Aus *Synechocystis* PCC 6803 wurden Thylakoide isoliert* (Norling *et al.*, 1998, Zak *et al.*, 1999) und in LM solubilisiert. Die Fokussierung erfolgte über Nacht in einem pH-Gradienten von 3–8 (vgl. 2.3.17). Nach dem Lauf wurden die interessanten Banden ausgeschabt und die darin enthaltenden Proteine sowie Pigmente

* die *Synechocystis*-Thylakoide (PS I⁻, chl⁻) erhielten wir im Rahmen einer Kooperation mit Christiane Funk, Stockholm

qualitativ analysiert. In Abbildung 3.34 ist die Vorgehensweise schematisch zusammengefasst. Die Sephadexmatrix wurde in mit Fritten bestückten Säulchen abfiltriert, die Proteine dabei in 10 mM Kaliumphosphat (KP) pH 7,8 überführt. Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit dem α -ScpC/D-Antikörper dekoriert. Die Pigmente wurden mittels Butanolextraktion isoliert und über HPLC-Analyse identifiziert (2.3.16).

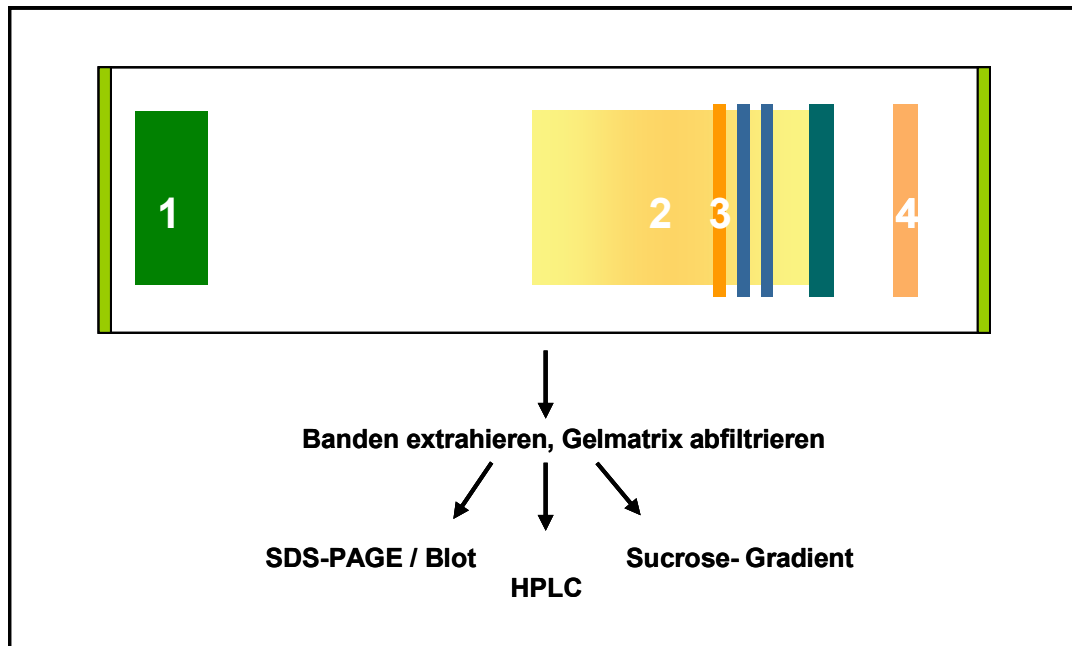


Abb. 3.34: IEF mit solubilisierten *Synechocystis*-Thylakoiden: Schematische Übersicht und Vorgehensweise zur Analyse der Banden. Thylakoide aus *Synechocystis* PCC 6803 wurden in 1% LM solubilisiert und ü.N. bei 4°C mit 8 Watt und unbegrenzten mA in einem pH-Gradienten von 3-8 fokussiert (vgl. 2.3.17). Die Banden 1-4 wurden ausgehoben und die Stärkematrix mit 10 mM Kaliumphosphat (KP) pH 7,8 abfiltriert. Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot identifiziert, Pigmente über HPLC-Analyse bestimmt. Die Stringenz der Pigmentbindung wurde mittels Saccharosedichtegradientenzentrifugation getestet.

Abbildung 3.35 zeigt eine IEF von solubilisierten *Synechocystis*-Thylakoiden nach erfolgter Auftrennung. Man erkennt neben der dunkelgrünen Auftragsfraktion mehrere orangefarbene sowie mehrere bläuliche Banden. Letztere sind auf die Phycobilisomen zurückzuführen. Es wurden jeweils die Auftragsfraktion sowie die mit 2, 3 und 4 bezeichneten Banden isoliert (2.3.17) und auf Protein- und Pigment-Zusammensetzung hin analysiert. Wie der Western Blot in Abbildung 3.36 zeigt, wurde ScpC/D in der orangenen Bande 4 nachgewiesen. Der α -ScpC/D-Antikörper reagiert mit einem Protein, das bei ca. 24 kD läuft. Außerdem zeigt sich ein höhermolekulares Signal. Für die ca. 6 kD großen ScpC/D sind höhermolekulare Aggregate schon beschrieben worden, sie sind vermutlich aufgrund der Hydrophobizität der Proteine auch in einem SDS-Gel stabil (Funk und Vermaas, 1999).

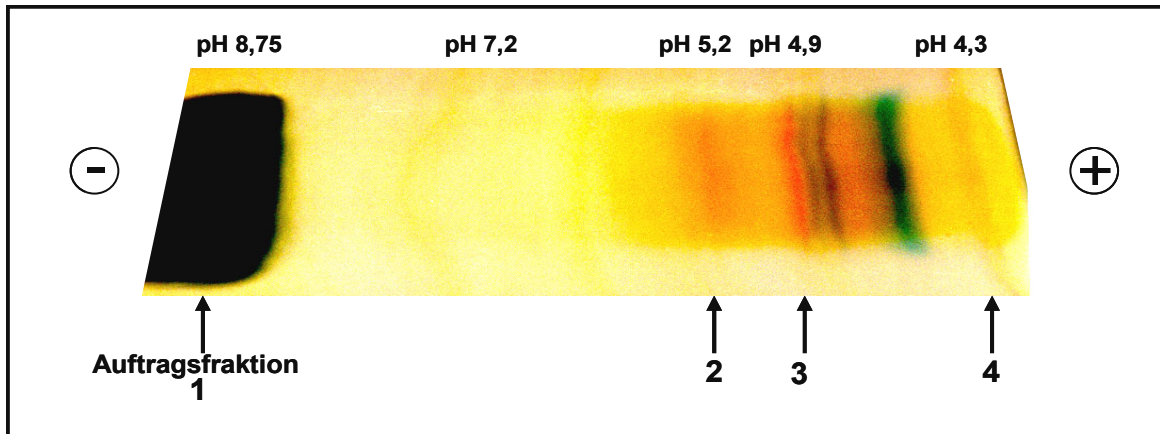


Abb. 3.35: IEF mit solubilierten *Synechocystis*-Thylakoiden. Thylakoide aus *Synechocystis* PCC 6803 wurden in 1% LM solubilisiert und ü.N. bei 4°C mit 8 Watt und unbegrenzten mA in einem pH-Gradienten von 3-8 fokussiert (vgl. 2.3.17). Die Banden wurden ausgehoben und die Stärkematrix abfiltriert.

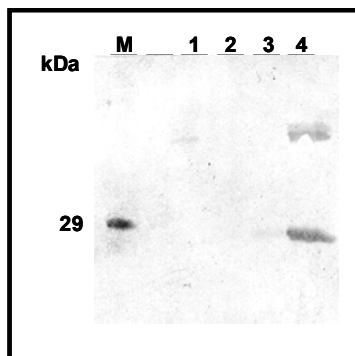


Abb. 3.36: Western Blot nach IEF mit solubilierten cyanobakteriellen Thylakoiden. Thylakoide aus *Synechocystis* PCC 6803 wurden in 1% LM solubilisiert und ü.N. bei 4°C mit 8 Watt und unbegrenzten mA in einem pH-Gradienten von 3-8 fokussiert (vgl. 2.3.17). Die Banden wurden ausgehoben und die Stärkematrix abfiltriert. Die Proteine wurden auf einer 15%-igen SDS-PAGE aufgetrennt und der Nachweis erfolgte mit dem α -ScpC/D-Antikörper (1:1000, vgl. 2.3.21).

Die Pigmentzusammensetzung der Banden 2–4 wurde per HPLC-Analyse identifiziert. Auf die Stöchiometrien wurde hier nicht näher eingegangen, da nicht eindeutig festgestellt werden konnte, ob es sich um ScpC, ScpD oder ein Gemisch aus beiden handelte. In den Banden 2 und 3 fanden sich Myxoxanthophyll, Zeaxanthin, Echinenon, Chl a und β -Carotin. Die Bande 4, in der ScpC/D detektiert wurde, enthielt Echinenon, Chl a und β -Carotin. Die Zusammensetzung war reproduzierbar, die Verhältnisse der Pigmente zueinander war jedoch nicht nach allen IEFs gleich (nicht gezeigt). Um auszuschließen, dass es sich bei der Pigmentierung der Bande 4 nur um eine zufällige Komigration im pH-Gradienten handelte, wurde diese auf einen Saccharosedichtegradienten (5 mM Tricine, 0,6 M Saccharose) aufgetragen. Nach der Zentrifugation war nur eine pigmentierte Bande zu sehen, in der ebenfalls ScpC/D nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt).

CD-spektroskopische Untersuchungen der Bande 4 ergaben sowohl vor als auch nach der Zentrifugation keinen Hinweis auf excitonische Kopplung der Pigmente

(nicht gezeigt). In Abbildung 3.37 sind die Ergebnisse zur Isolation und dem Pigmentgehalt der pigmentierten ScpC/D-Bande nochmals zusammengefasst.

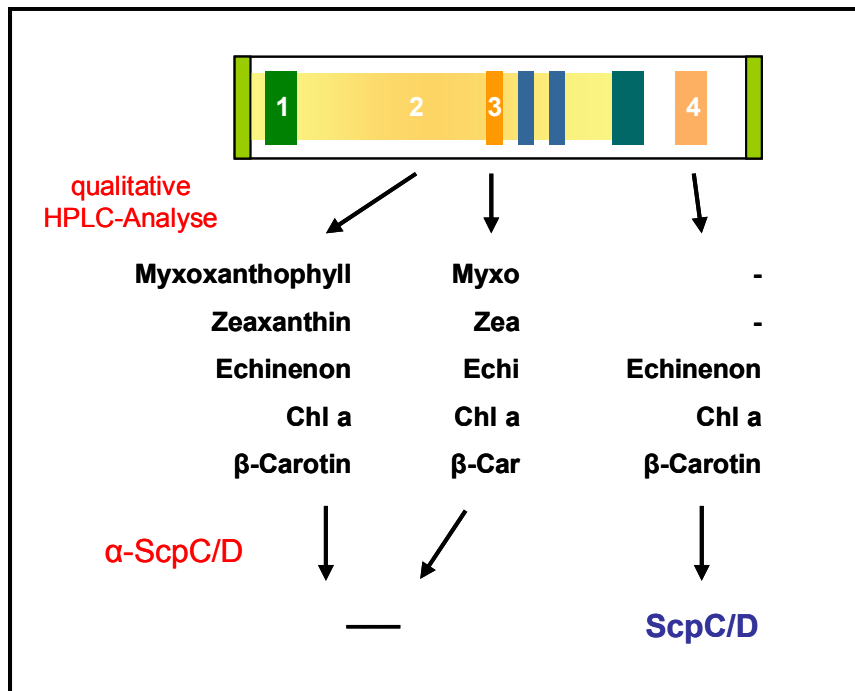


Abb. 3.37: Lokalisation und Pigmentierung von ScpC/D, Übersicht.

3.3.2. Versuche zur Pigmentierung rekombinanter Scp's *in vitro*

Ausgehend von der Information der in der ScpC/D-Bande detektierten Pigmente Echinenon, Chlorophyll a und β-Carotin sollte der nächste Schritt die Rekonstitution von rekombinantem ScpC und D sein, die im Rahmen der Kooperation mit der AG um Christiane Funk kloniert und überexprimiert wurden (Hao *et al.*, 2001). Erste Rekonstitutionsversuche wurden vergleichend zum LHCP durch Detergenswechsel, durch Verdünnung aus SDS und mit Frier-Tau-Zyklen durchgeführt. Es wurde zunächst Totalpigment aus der Erbse und aus Cyanobakterien verwendet. Die Kontroll-Rekonstitution des LHCP mit Totalpigment aus der Erbse verlief in allen Fällen erfolgreich. Eine Pigmentbindung konnte für die Scp's jedoch weder im Gelsystem noch mit CD-Spektroskopie nachgewiesen werden (Hao *et al.*, 2001). Weitere Versuche zur Rekonstitution von Heterooligomeren der Scp-Proteine werden im Labor von Christiane Funk durchgeführt.

ScpC/D lassen sich also *in vivo* durch IEF und anschließende Saccharose-dichtegradientenzentrifugation mit Echinenon, Chlorophyll a und β-Carotin isolieren. Es wurde kein Hinweis auf excitonische Kopplung der Pigmente gefunden und *in vitro*-Rekonstitution der rekombinanten Proteine zeigte bisher keinen Hinweis auf Erfolg.

3.4. „One-helix-protein“ und „stress-enhanced proteins“: Versuche zur Pigmentierung *in vitro**

OHP, das „one-helix-protein“, sowie Sep1 & 2, die „Stress-enhanced proteins“ aus *Arabidopsis thaliana*, gehören als kurze Sequenzverwandte des LHC II zur Cab-Proteinfamilie. Sie sind der Untergruppe der ELIPs, der „early light-induced proteins“ zuzurechnen, das OHP weist außerdem Homologien zu den „high-light inducible proteins“, HLIPs, auf. Den ELIPs wird im Allgemeinen eine Schutzfunktion zugeschrieben, die sie evtl. durch transiente Pigmentbindung ausüben könnten. Genaueres ist darüber noch nicht bekannt. Der Nachweis einer Pigmentbindung sowie die Charakterisierung möglicher Rekonstitutionsprodukte könnte nähere Informationen dazu liefern. Aus diesem Grund wurde versucht, rekombinantes OHP, Sep1 und Sep2 *in vitro* mit Pigmenten zu falten.

Die für OHP codierende DNA aus *A. thaliana* wurde unserer Arbeitsgruppe von Stefan Jansson zu Verfügung gestellt und in den Vektor pDS 12 eingefügt (Diplomarbeit S. Raunser, 2000). Die Proteine Sep1 & 2 wurden im Rahmen einer Kooperation mit Iwona Adamska, Stockholm, überexprimiert und uns zur Verfügung gestellt.

3.4.1. Versuche zur Pigmentbindung

Wie schon für Rekonstitutionsversuche am PsbS beschrieben, wurden auch für die Rückfaltungsexperimente von OHP und den Sep-Proteinen verschiedene Methoden sowie unterschiedliche Nachweissysteme getestet. Zunächst wurde der Nachweis der Rekonstitution über schwach denaturierende Gele mit LDS- oder Deriphat- Puffer geführt, dies entspricht der Standardmethode für die Rekonstitution des LHCP.

Für OHP wie für Sep1 und Sep2 wurden verschiedene Rekonstitutionsmethoden in unterschiedlichen Variationen getestet, über die hier zunächst ein Überblick gegeben werden soll. Es wurden Rückfaltungsexperimente über Frier-Tau-Zyklen, Detergenswechsel und durch Verdünnung aus SDS durchgeführt. Die Analyse möglicher Rekonstitutionsprodukte auf einem schwach denaturierenden, 15%-igen PAA-Gel ergab jedoch keine erkennbaren pigmentierten Banden. Dies galt sowohl für Gele mit LDS-Puffer als auch für noch etwas schonendere Bedingungen mit Deriphat-Puffer.

*Die Experimente zur Rekonstitution von Sep2 wurden von Katrin Schumacher im Rahmen ihrer von mir mitbetreuten Staatsexamensarbeit durchgeführt.

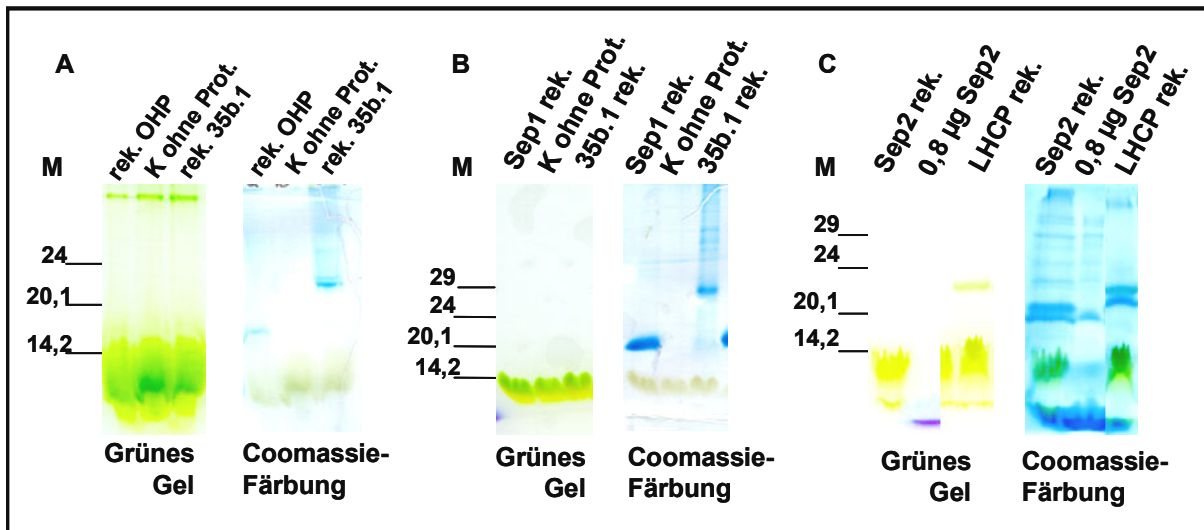


Abb. 3.38: Rekonstitutionen von OHP, Sep1 und Sep2 und Nachweis über schwach denaturierende PAGE. Exemplarisch für die getesteten Methoden sind Rekonstitutionen der drei Proteine im Vergleich mit dem LHC II Monomer und dem nicht rekonstituierenden LHCP-Klon 35b.1 dargestellt. **A:** OHP und 35b.1 wurden mit Totalpigment mit der Frier-Tau-Methode rekonstituiert (vgl. 2.3.10.2) und auf einem 15%-igen Deriphat-Gel aufgetrennt. **B:** Sep1 und 35b.1 wurden durch Detergenswechsel mit Totalpigment rekonstituiert (vgl. 2.3.10.1) und auf einem 15%-igen Deriphat-Gel aufgetrennt. Als Kontrolle wurde wie auch bei A eine Rekonstitution ohne Protein mitgeführt. **C:** Sep2 und LHCP wurden durch Verdünnung aus SDS mit Totalpigment rekonstituiert (vgl. 2.3.10.3) und auf einem 15%-igen Deriphat-Gel aufgetrennt. Es wurden 0,8 µg denaturiertes Sep2 mit aufgetragen. Gezeigt sind für alle drei Proteine jeweils der Scan des grünen Gels und die Coomassie-Färbung desselben Gels. K, Kontrolle; M, Marker; rek., rekonstituiert. (Die Rekonstitution des Sep2 wurde von Katrin Schumacher im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt.)

In Abbildung 3.38 sind exemplarisch für alle durchgeführten Variationen schwach denaturierende Deriphat-Gele gezeigt, auf denen rekonstituiertes OHP, Sep1 und Sep2 aufgetrennt wurden. OHP wurde nach der Frier-Tau-Methode (vgl. 2.3.10.2) mit Totalpigment rekonstituiert (A). Zum Vergleich wurde eine Kontroll-Rekonstitution ohne Protein und eine Kontrolle mit dem nicht rekonstituierbaren LHCP-Klon 35b.1 mitgeführt. Diesem Klon fehlt die Schleifenregion zwischen der zweiten und dritten Transmembranhelix (Heineman, 1999; vgl. auch Anhang). Im Laufverhalten der Ansätze auf dem „grünen Gel“ ist kein Unterschied zu erkennen, im Rekonstitutionsansatz mit OHP ließ sich keine pigmentierte Bande detektieren. In allen drei Ansätzen erkennt man grüne Banden, die an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel laufen. Diese stellen vermutlich Chlorophyll-Aggregate dar. Die Coomassie-Färbung zeigt deutlich, dass sich kein Protein in der Bande befindet. Sep1 wurde durch Detergenswechsel ebenfalls mit Totalpigment rekonstituiert (B, vgl. 2.3.10.1). Auch hier wurden Kontroll-Rekonstitutionen ohne Protein bzw. mit 35b.1 mitgeführt. Das Ergebnis ist dasselbe wie schon für die Rekonstitution des OHP beschrieben: es konnte kein Hinweis auf Pigmentbindung an das Protein gefunden werden. Unter C schließlich ist eine Rekonstitution von Sep2 mit Totalpigment durch Verdünnung aus SDS dargestellt (vgl. 2.3.10.3). Hier wurde neben der Rekonstitution ohne Protein gefalteter LHC II als Positivkontrolle mit auf das Gel aufgetragen. Man erkennt deutlich die pigmentierte Bande der LHC II Monomere. Im Coomassie-Gel ist unterhalb davon eine zweite Proteinbande zu

sehen, die auf nicht gefaltetes Protein zurückzuführen ist. Für Sep2 ergibt sich im „grünen Gel“ dasselbe Bild wie für die beiden zuvor beschriebenen Proteine. Es ist kein Hinweis auf Pigmentbindung zu erkennen. Nach der Coomassie-Färbung läßt sich in der Spur des rekonstituierten Sep2 auch eine Doppelbande erkennen. Diese repräsentiert jedoch keine unterschiedlichen pigmentabhängigen Faltungszustände, sondern stellte sich als vermutlich detergensabhängiges Artefakt heraus, das auch bei einer Kontroll-Rekonstitution ohne Pigmente auftrat (vgl. Staatsexamensarbeit Katrin Schumacher, 2001). Die Abbildung 3.38 zeigt, dass mit den verwendeten Methoden weder für OHP noch für Sep1 und Sep2 der Nachweis einer Rekonstitution erbracht werden konnte.

Um auszuschließen, dass das recht kleine OHP vom freien Pigment überlagert wird, wurden Gele mit höherem Acrylamidgehalt (18%, 20% PAA) zur Auftrennung verwendet, aber auch mit verbesserter Auftrennung im Gel zeigte sich kein Hinweis auf Pigmentbindung. Als weitere Variation wurde die Rekonstitution mit unterschiedlichem Pigmentangebot getestet, es wurde neben Totalpigment in verschiedenen Verhältnissen zum Protein auch solches verwendet, das mit unterschiedlichen Mengen an Carotinoiden angereichert war, sowie Chlorophylle im Verhältnis $a/b = 3:1$. Außerdem wurde durch Zugabe von Glycerin oder des Membranlipids Phosphatidylglycerol (PG), welches bei der Trimerisierung des LHCP eine Rolle spielt, versucht, ein mögliches OHP-Rekonstitutionsprodukt zu stabilisieren. Um herauszufinden, ob die pigmentinduzierte Faltung von OHP und Sep1 ein anderes pH-Optimum hat als für die LHCP-Rekonstitution beschrieben, wurden neben dem Standard-Puffer für LHCP mit pH 9,0 noch Rekonstitutionsexperimente bei anderen pH-Werten (6,8-9,0) durchgeführt. Des Weiteren wurde der Ausgangszustand des Proteins vor der Faltung durch Denaturierung bzw. Variationen im Reduktionsmittel (0,5-10 mM DTT/2-ME) verändert.

Keine der beschriebenen Modifikationen der Rückfaltungsprozeduren führte zur Detektion pigmentierter Rekonstitutionsprodukte im Gel. Das legte zwei Vermutungen nahe: Einerseits könnten sowohl OHP als auch die Sep-Proteine *in vitro* wie *in vivo* keine Pigmente binden. Da über die Funktion dieser kurzen Sequenzverwandten jedoch noch nichts bekannt ist und u.a. über eine Rolle als transienter Pigmentcarrier spekuliert wird, könnte andererseits auch das Gelsystem zur Detektion schwacher oder transienter Protein-Pigment-Interaktionen zu stringent sein. Um dies auszuschließen, wurde im Folgenden die CD-Spektroskopie als Nachweissystem für die Rekonstitution der drei Proteine herangezogen.

Die CD-Spektroskopie bietet den Vorteil, mit relativ geringem Zeitaufwand viele verschiedene Proben zu vermessen. Die Rückfaltung erfolgte mit den schon genannten Methoden, vorwiegend aber durch Verdünnung aus SDS. Von den Rekonstitutionsansätzen wurden dann CD-Spektren aufgenommen. Dabei wurde

im sichtbaren Bereich stets eine Kontroll-Rekonstitution ohne Protein mitgeführt, um Abweichungen vom intrinsischen CD-Signal der Pigmente detektieren zu können. Ein Problem stellte zunächst die Aggregatbildung dar. Aggregate von Chlorophyllen und Carotinoiden sind durch sehr ausgeprägte Signale zu erkennen und überdecken evtl. schwächere Signale von Komplexen. Um auch eine geeignete Positivkontrolle für die Rekonstitution zu haben, wurden daher für das LHC II-Monomer die optimalen Parameter ermittelt, die zur Detektion von nicht aufgereinigten LHC II-Monomeren benötigt werden. Dabei wurde besonders auf die Vermeidung von Pigmentaggregaten geachtet sowie auf ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis. Es stellte sich heraus, dass die geeignete LHCP-Konzentration 1 µg Protein/µl betragen sollte, der stöchiometrische Pigmentüberschuss sollte die 1,6-fache Menge nicht zu weit überschreiten. Das beste Signal-Rausch-Verhältnis bei der Messung in einer Quarzküvette mit 0,2 cm Schichtdicke und 4°C brachten folgende Messparameter:

<i>Scan speed:</i>	50 nm/min	<i>Data Pitch:</i>	0,5 nm
<i>Band width:</i>	4 nm	<i>Response Time:</i>	4 sec

Im Folgenden dienen die für die LHCP-Rekonstitution eingestellten Parameter als Ausgangspunkt für die Rekonstitution von OHP, Sep1 und Sep2.

Die für den Nachweis im Gel getesteten Variationen wurden auch für den Nachweis über CD-Spektroskopie durchgeführt. Außerdem wurde versucht, Sep1 und Sep2 sowie eines der beiden mit OHP zu kombinieren. Als Vergleich wurde das CD-Spektrum der rekonstituierten Probe jeweils mit dem einer Kontroll-Rekonstitution ohne Protein verglichen. So sollte ausgeschlossen werden, dass ein mögliches CD-Signal von unspezifischen Pigment-Pigment-Interaktionen herrührte. Abbildung 3.39 zeigt CD-Spektren von Sep2, das mit Totalpigment durch Verdünnung aus SDS rekonstituiert wurde. Das Spektrum A ist im sichtbaren Spektralbereich aufgenommen. Das Spektrum der Kontroll-Rekonstitution zeigt starke Signale um 400 nm und oberhalb von 700 nm, die rekonstituierte Probe zeigt sehr kleine Signale, die aber nur schwächere Varianten der Signale sind, die in der Kontrolle auftauchen. Die Signale der Kontroll-Rekonstitution sind typisch für Chlorophyll (>700 nm) und Carotinoid-Aggregate (~400 nm), die in der rekonstituierten Probe allerdings deutlich vermindert sind. Das bedeutet, dass die Anwesenheit von Sep2 in der Lösung die Aggregation von Pigmenten verringert. Das gleiche Phänomen wurde auch für Sep1 beobachtet, die Reproduzierbarkeit der Sep1-Spektren war jedoch geringer als für Sep2. Aus dem Spektrum läßt sich kein Hinweis auf excitonische Wechselwirkungen zwischen an das Protein gekoppelten Pigmenten ableiten.

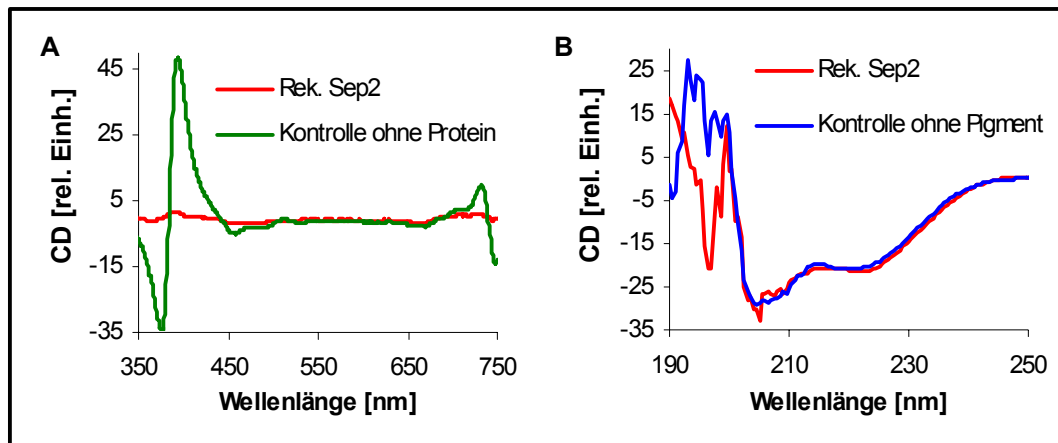


Abb. 3.39: CD-Spektren von rekonstituiertem Sep2 im UV- und im VIS-Bereich. Sep2 wurde durch Verdünnung aus SDS mit Totalpigment rekonstituiert (vgl. 2.III.10.3) und CD-spektroskopisch vermessen (vgl. 2.IV.2). Als Kontrolle im UV-Bereich wurde ein Rekonstitutionsansatz ohne Pigment, im VIS-Bereich ein Ansatz ohne Protein mitgeführt. **A:** CD im sichtbaren Bereich (VIS). **B:** Protein-CD. rek., rekonstituiert. (Dieser Versuch wurde von Katrin Schumacher im Rahmen ihrer Staatsexamensarbeit durchgeführt.)

CD-Spektroskopie kann im UV-Bereich Informationen über die Sekundärstruktur eines Proteins geben. Um einen Einblick in die Proteinfaltung in Gegenwart von Pigmenten zu erhalten, wurden OHP, Sep1 und Sep2 rekonstituiert und CD-Spektren im UV-Bereich aufgenommen. Abbildung 3.39 zeigt ein Spektrum von rekonstituiertem Sep2 und einer Kontroll-Rekonstitution ohne Pigmente. Im Bereich oberhalb von 200 nm sind die beiden Spektren identisch, was andeutet, dass sich die Sekundärstruktur von Sep2 während der Rekonstitution nicht ändert. Unterhalb von 200 nm ist bei beiden Spektren ein starkes Rauschen zu erkennen, was an absorbierenden Substanzen wie Detergentien, Reduktionsmitteln, aber auch den Pigmenten in der rekonstituierten Probe liegen kann.

In Abbildung 3.40 sind UVCD-Spektren des rekonstituierten LHC II-Monomers (A) im Vergleich zu OHP (B) und Sep1 (C) aufgeführt. Auch hier wurde als Kontrolle bei den jeweiligen Ansätzen das Pigment weggelassen. Das LHC II-Monomer zeigt im Vergleich zu der Kontrolle einen höheren Helixanteil, was an der Zunahme des negativen Signals um 220 nm zu erkennen ist. Ein weiteres Indiz dafür wäre ein Anstieg des positiven Peaks bei 195 nm. Dieser ist in der rekonstituierten Probe jedoch wegen pigmentabhängigen Rauschens nicht zu erkennen. Aus diesem Grund wurden die Helixanteile nicht näher quantifiziert. Das UVCD-Spektrum von rekonstituiertem OHP zeigte im Vergleich mit der Kontrolle keinen Unterschied im Signal um 220 nm, daher kann auch nicht von pigmentinduzierter Veränderung der Sekundärstruktur gesprochen werden (Abb. 3.40 B). Für Sep1 gilt im Prinzip das Gleiche, nach Rekonstitution ergibt sich eine etwas deutlichere Trennung in die beiden Peaks bei 210 und 220 nm, als es bei der Kontrolle der Fall ist. Dennoch kann über den Helixanteil beider Proben keine Aussage gemacht werden.

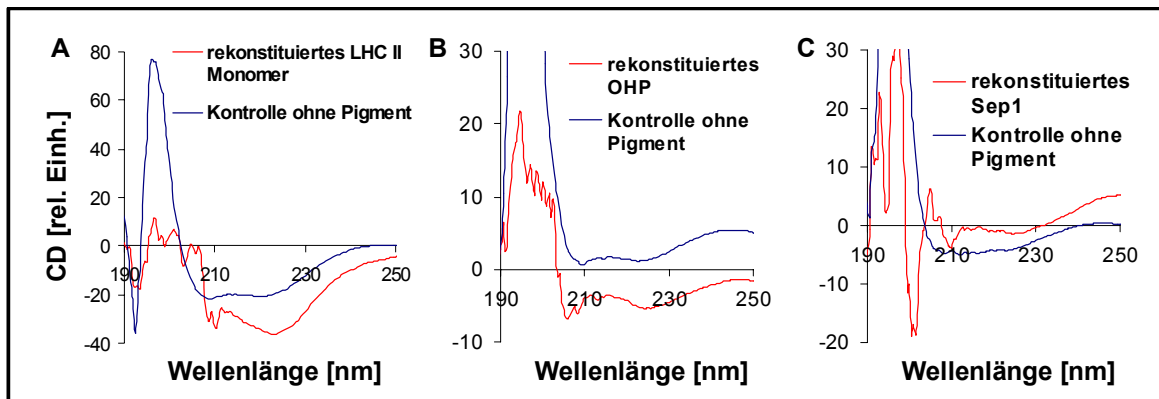


Abb. 3.40: UV-CD-Spektren von rekonstituiertem OHP und Sep1 im Vergleich mit dem LHC II Monomer. Die Proteine wurden durch Verdünnen aus SDS mit Totalpigment bzw. als Kontrolle ohne Pigment rekonstituiert. UV-CD-Spektren wurden aufgenommen wie unter 2.4.2 beschrieben.

Die CD-Spektroskopie als Detektionssystem möglicher Rekonstitutionsprodukte der kurzen *Cab*-Proteine erbrachte keinen Hinweis auf pigmentinduzierte Faltung der untersuchten Proteine. Für den Nachweis bzw. die Aufreinigung von möglichen OHP- und Sep1-Rekonstitutionsprodukten wurde die besonders milde Methode der IEF getestet. OHP bzw. Sep1 wurden rekonstituiert und auf eine präparative IEF mit OG bzw. LM als Detergens aufgetragen (nicht gezeigt). Als Kontrolle diente eine Rekonstitution ohne Protein. Nach dem Lauf konnten weder mit OG noch mit LM als Detergens Unterschiede zwischen der Rekonstitution und der Kontrolle festgestellt werden. Die Banden wurden mittels CD-Spektroskopie untersucht, die Protein enthaltende Bande ließ jedoch keinen Hinweis auf Interaktionen der Pigmente erkennen.

Für die Trennung möglicher OHP-Rekonstitutionsprodukte wurden neben dem Gelsystem auch Saccharosedichtegradienten verwendet (nicht gezeigt), die es eher erlauben, labilere Komplexe zu isolieren als die Gelelektrophorese. Es wurde 0,6 M Saccharose eingesetzt (das entspricht einem Gradienten von 0 nach 1,2 M), die Zentrifugation erfolgte 16 Stunden bei 4°C und 400000 x g. Als Kontrolle wurden Rekonstitutionen ohne Protein und Rekonstitutionen mit BSA, einem nicht rekonstituierbaren LHCP-Klon 35b.1 und SecYG, einem nicht Pigmente bindenden Membranprotein, durchgeführt. Nach Zentrifugation war bei der OHP-Rekonstitution sowie allen Kontrollen, die andere Proteine enthielten, neben dem freien Protein eine pigmentierte Bande zu erkennen. Durch UVCD-Spektren wurde verifiziert, dass sich in dieser Bande Protein befand. Die Ergebnisse dieses Versuchs deuten auf eine unspezifische Wechselwirkung von freiem Pigment und Protein im Allgemeinen hin, zumal für das OHP auch keine reproduzierbaren Pigmentstöchiometrien gefunden werden konnten (nicht gezeigt).

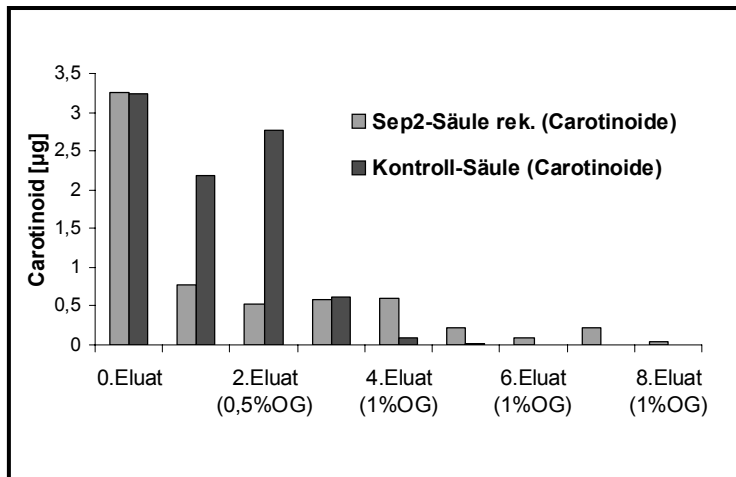


Abb.3.41: Rekonstitution von Sep2 durch Immobilisation auf einer Ni²⁺-Säule: HPLC-Analyse der Waschschrte. Sep2 wurde auf der Ni²⁺-Säule immobilisiert und mit Carotinoiden rekonstituiert (vgl. Staatsexamensarbeit Katrin Schumacher, 2001). Das 0. Eluat bezeichnet den Durchfluss der Pigmentlösung, die Eluate 1-8 sind Waschschrte mit 10 mM Tris-HCl und der angegebenen OG-Konzentration. Die Carotinoide wurden mit Butanol extrahiert und mittels HPLC-Analyse quantifiziert. Rek., rekonstituiert.

Für Sep2 wurde eine Rekonstitution von immobilisiertem Protein mit Carotinoiden getestet. Dazu wurde das einen His-Tag tragende Protein an eine mit Ni²⁺-Ionen beladene Sepharose-Säule gebunden und durch Inkubation der Säule mit Pigmenten rekonstituiert. Die Säule wurde anschließend mit OG-haltigem Puffer gewaschen, bis sie völlig entfärbt war. Das Protein wurde aus materialtechnischen Gründen auf der Säule belassen, die Eluate wurden auf ihren Protein- und Pigment-Gehalt hin untersucht. In Abbildung 3.41 ist die Carotinoide menge in den einzelnen Eluaten gezeigt. Es fällt auf, dass von der Kontroll-Säule ohne Protein die Carotinoide schon in den ersten drei Eluaten nahezu vollständig von der Säule gewaschen wurden. Auf der Säule mit gebundenem Sep2 wurden die Carotinoide jedoch wesentlich länger zurückgehalten. Dieser Versuch wurde ebenfalls mit Totalpigment und einer LHCP-Säule als Positivkontrolle durchgeführt, brachte aber nicht dasselbe Ergebnis. Allerdings wurden hier wegen Gleichheit der Bedingungen zur LHCP-Kontrolle stringendere Waschbedingungen als für die Sep2-Rekonstitution mit Carotinoiden gewählt. Eine Reproduktion letzterer war mangels Proteinmaterials nicht durchführbar (vgl. auch Diplomarbeit Katrin Schumacher, 2001).

3.4.2. Homologie-Modelling des OHP*

Die gezeigten Ergebnisse zur Pigmentbindung des OHPs lassen vermuten, dass dieses kurze *Cab*-Protein entweder keine Pigmente bindet, oder diese nur transient anlagert. Im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Molekulare Biophysik wurde mit der Sequenz von OHP ein Homologie-Modelling durchgeführt. Dabei diente die durch Elektronenstreuung gewonnene Struktur des LHC II (Kühlbrandt *et al.*, 1994) als Vorlage. Mit einem Modell des OHPs sollte die Sekundärstruktur des Proteins sowie die theoretischen Möglichkeiten zur Pigmentbindung abgeschätzt werden.

*Das Homologie-Modelling des OHP wurde von Thorsten Schweickardt im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Molekulare Biophysik an der Universität Manz durchgeführt.

Zunächst wurde mit einem Sequenzvergleich abgeschätzt, ob die Sequenz von OHP zu der des LHC II ausreichend homolog ist, um eine Strukturvorhersage in Anlehnung an das Kühlbrandt-Modell zu machen. Es zeigte sich, dass die vermutete Transmembranhelix (EIWNSRACMIGLIGTFIVELILNKGILE) 35% Identität und 53% Homologie zur entsprechenden Sequenz des LHC II aufweist. Nach Anpassung des Alignments mit Rücksichtnahme auf Homologien der ELIP/HLIP-Proteine wurde eine Transmembranhelix mit einer Länge von ca. 44 Å vorhergesagt. Diese Länge entspricht der Dicke einer typischen Doppelmembran mit 45 Å (Stryer, 1990). In Abbildung 3.42 sind zwei Darstellungen eines Homologie-Modells gezeigt. Teil B gibt einen Überblick über die helikalen Bereiche, in Teil A sieht man eine Wireframe-Darstellung mit der hypothetischen Lage zweier Chlorophylle. Im Bereich der Helix liegt ein Glutamat (E 28) und ein Asparagin (N 31), die eine Voraussetzung für die Bindung von Chlorophyll darstellen. Es wurden zwei Chlorophylle in das Modell integriert und bei näherer Untersuchung ergab sich, dass sie die energetisch ungünstige Ladung des Glutamates und des Asparagins in der Membran neutralisieren. Für das Glutamat (E 5) im N-Terminus ist ebenfalls eine Chlorophyllbindung möglich, jedoch müsste dazu die Lage des N-Terminus näher bekannt sein. Dieser ist im Kühlbrandt-Modell des LHC II nicht aufgelöst und kann aus dem Grund auch für die Strukturvorhersage des OHP nicht verwendet werden.

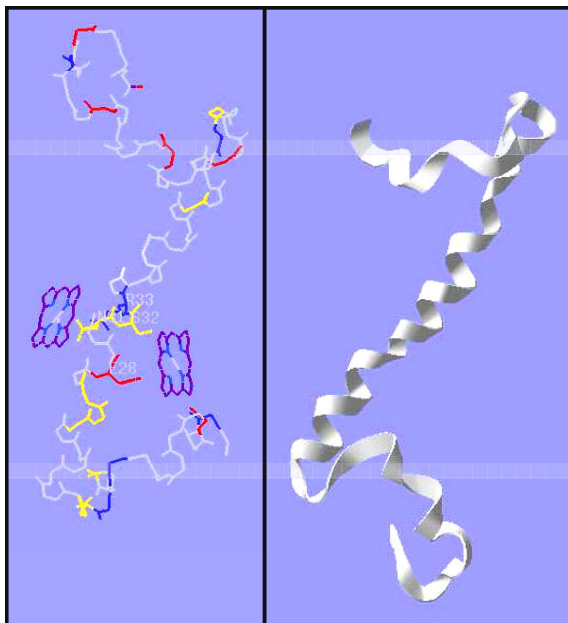


Abb. 3.42: Homologie-Modelling des OHP. Als Vorlage diente die Struktur des LHC II (Kühlbrandt *et al.*, 1994). A: Wireframe-Darstellung mit extrapolierten Chlorophyllen. Grau dargestellt, unpolare AS; gelb, polare AS; rot, saure AS; blau, basische AS. B: Lage der helikalen Bereiche. Das Modellierung wurde von Thorsten Schweickardt im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Molekulare Biophysik, Universität Mainz, durchgeführt.

Im LHC II spielen Wechselwirkungen zwischen Glutamin und Arginin eine strukturelle Rolle in der Interaktion zwischen den Helices 1 und 3 (Kühlbrandt *et al.*, 1994). Da diese Bereiche in anderen Mitgliedern der Cab-Proteinfamilie konserviert und auch im OHP vertreten sind, wird über eine mögliche Dimerisierung zweier OHPs spekuliert (Jansson *et al.*, 2000). In der Transmembranhelix stehen dafür das Arginin 33 und das Glutamat 28 zur Verfügung. Zur Bildung von Homo- oder

Heterodimeren mit anderen *Cab*-Proteinen kann jedoch aufgrund des Modellings keine Aussage gemacht werden.

Eine Bindung von 2-3 Chlorophyllen sowie eine Dimerisierung scheint für das OHP theoretisch möglich zu sein, die Frage, ob das Protein Pigmente transient oder gar nicht bindet, ist damit jedoch weiterhin offen.

3.4.3. Import von OHP in isolierte Erbsenchloroplasten *

Um sich der Funktion des OHPs auf andere Weise zu nähern, sollte im Folgenden der Weg des Proteins in die Chloroplasten bzw. die Thylakoidmembran näher verfolgt werden. Jansson und Mitarbeiter beschrieben 2000 den erfolgreichen Import von OHP in Erbsenthylakoide. Sie bedienten sich dabei eines Weizenkeimextrakt-Translationssystems, der Nachweis des prozessierten OHPs erfolgte radioaktiv.

In dieser Arbeit wurde eine Importprozedur mit anschließendem immunologischem Nachweis des Proteins verwendet (variiert nach Kuttkat, 1997, vgl. auch 2.3.18). Das Protein wurde dazu in Harnstoff denaturiert, dieser wurde nach Zugabe von Blattextrakt, der für den Import wichtige Kofaktoren enthält, durch Dialyse aus dem System entfernt. Die Importprozedur erfolgte unter Zugabe von ATP mit Zusatzlicht in frisch isolierte Erbsenchloroplasten. Nach der Importprozedur wurde die Chloroplastensuspension halbiert, eine Hälfte wurde mit Thermolysin behandelt um unspezifisch mit der Außenmembran assoziiertes Protein zu entfernen, die andere Hälfte wurde umbehandelt gelassen. Nach anschließender Lyse der Chloroplasten wurde die Thylakoidfraktion ebenfalls halbiert und ein Teil davon mit Thermolysin behandelt. Der Nachweis des Importes wurde immunologisch über einen Western-Blot geführt (vgl. 2.3.21). Anhand einer OHP-spezifischen Bande bei ca. 6 kD in den Thermolysin-behandelten Fraktionen sollte abgeschätzt werden, ob das Protein zunächst in die Chloroplasten und als matures Protein weiter in die Thylakoide transportiert wird. Im Fall eines Importes wird die Signalsequenz beim Eintritt in den Chloroplasten abgespalten. Wird das zum maturen Protein prozessierte OHP in die Thylakoidmembran inseriert, so ist es dort vor dem Angriff der Protease geschützt und das Signal auf dem Blot erscheint bei ca. 6 kD. Abbildung 3.43 B zeigt einen solchen Import von OHP in isolierte Erbsenthylakoide. Zum Nachweis wurde der α -His₅-Antikörper verwendet. Man erkennt Signale bei ca. 12 kD in allen Thylakoid-Proben, unabhängig davon, ob die Chloroplasten oder die Thylakoide zuvor mit Thermolysin behandelt worden waren. Als Kontrolle ist denaturiertes OHP mit aufgetragen, im Vergleich dazu zeigt sich keinerlei Hinweis auf Prozessierung bei den Proben des Importes. Die ebenfalls erkennbaren höhermolekularen Banden

*Die Experimente zum Import von OHP in isolierte Erbsenthylakoide wurden von Sonja Grundler im Rahmen ihrer von mir mitbetreuten Diplomarbeit durchgeführt.

treten sowohl nach Import als auch beim denaturierten Protein auf und sind vermutlich auf Proteinaggregate zurückzuführen. Es konnte also kein Hinweis auf den Import des OHP gefunden werden. Um auszuschließen, dass die Chloroplasten während der Präparation Schaden genommen hatten, wurde als Kontrolle auf ihre Intaktheit ein Import mit dem pLHCP- Klon C2.4h durchgeführt (Abb. 3.43 A). Hier erkennt man in der Thylakoidfraktion der unbehandelten Chloroplasten das Vorläufermolekül, welches auf derselben Höhe läuft wie das denaturierte C2.4h. Nach Proteasebehandlung der Chloroplasten lassen sich nach erneuter Thermolysin-Behandlung der Thylakoide Abbauprodukte erkennen: in den unbehandelten Thylakoiden erscheint das mature LHCP bei ca. 25 kD, während sich nach Proteasebehandlung das Abbauprodukt trimerer Komplexe (DP, bei 23 kD) und das Abbauprodukt monomerer Komplexe (DP*, bei 20 kD) erkennen lässt. Das importierte und in die Thylakoidmembran inserierte LHCP konnte hier unter Verwendung des α -His₅-Antikörpers erstmalig immunologisch nachgewiesen werden.

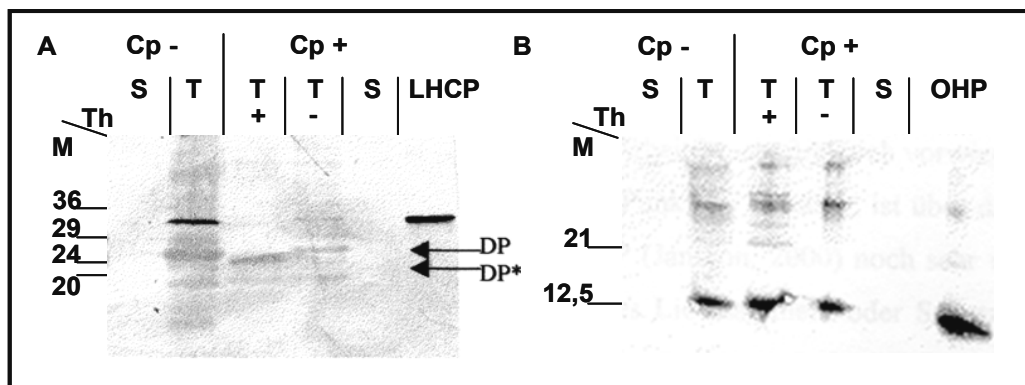


Abb. 3.43: Import von LHC II und OHP in Erbsenchloroplasten. Der LHC II-Klon C2.4h (A) wurde importiert, auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit dem α -His₅-Antikörper (1:2000) dekoriert (vgl. 2.3.21). Die Auftrennung des OHP-Klons SR7his2 (B) nach dem Import erfolgte in einem Gel nach Schägger & von Jagow (vgl. Diplomarbeit Sonja Grundler, 2002). Bei A und B wurde die Importprozedur wie unter 2.3.18 beschrieben durchgeführt. Cp, Chloroplasten; M, Marker; S, Stroma; T, Thylakoide; Th, Thermolysin; +, nach Proteasebehandlung; -, ohne Thermolysin- Verdau; DP, Degradationsprodukt trimerer Komplexe; DP*, Degradationsprodukt monomerer Komplexe.

Der Import von OHP in isolierte Chloroplasten ist schon beschrieben worden (Jansson *et al.*, 2000). Da er wie oben erläutert in dem verwendeten System nicht nachgewiesen werden konnte, wurden verschiedene Variationen durchgeführt, um die Importprozedur mit Inclusion Bodies als Ausgangsprodukt und immunologischer Detektion des Proteins zu optimieren. Es wurde einerseits die Menge an Blattextrakt variiert um sicherzustellen, dass nicht ein Mangel an Kofaktoren und GTP vorlag. Andererseits wurden Bedingungen während des Importes variiert, wie die Intensität des Zusatzlichtes und die Dauer der Reaktion. Am Nachweissystem wurde das Gelsystem von 15%-igem bzw. 18%-igem PAA-Gel (Lämmli) zum Gel

nach Schägger und von Jagow verändert (vgl. auch Diplomarbeit Sonja Grundler, 2002). Alle getesteten Optimierungsversuche zeigten jedoch keinen Hinweis auf Prozessierung des OHPs. In den Proben nach Verdau der Chloroplasten und der Thylakoide war in den Signalen kein Unterschied zur Kontrolle zu sehen. Daher sollte untersucht werden, ob es sich bei dem nicht prozessierten OHP dennoch um importiertes Protein handeln könnte oder um unspezifisch aggregiertes und daher proteaseresistentes OHP. Aus diesem Grund wurden Versuche unternommen, den Import zu hemmen. Dabei wurden die folgenden Möglichkeiten getestet: Es wurde auf die Zugabe von ATP als Energielieferant für die Importprozedur verzichtet. Zusätzlich wurde bei einigen Versuchen Apyrase zugeführt, um auch im System neu gebildetes ATP zu AMP abzubauen und somit zu zerstören. Es wurde außerdem getestet, zu dem Importansatz keinen Blattextrakt zuzusetzen und der Import wurde auch statt mit Zusatzlicht im Dunkeln durchgeführt. Ein weiterer Versuch der Hemmung des Importes wurde durch Zugabe von NiCl_2 zum Importansatz getestet. Das Protein, welches das NiCl_2 über den His-Tag bindet, sollte sterisch nicht mehr in der Lage sein, den Importkanal zu passieren. Da auch die Versuche zur Hemmung des Importes keine Information über dessen Erfolg brachten, muss davon ausgegangen werden, dass sich unspezifische OHP-Aggregate bilden konnten und so das Protein vor dem Angriff des Thermolysins geschützt war. Es wäre jedoch denkbar, dass der Import in Erbsenchloroplasten aufgrund von fehlenden oder modifizierten Kofaktoren nicht möglich ist. Da OHP in *A. thaliana* identifiziert worden ist, könnte es sein, dass nur die Chloroplasten dieses Systems für einen Import, wie er hier beschrieben wurde, geeignet sind. Aus diesem Grund wurde versucht, OHP in isolierte *Arabidopsis*-Chloroplasten zu importieren.

3.4.4. Import von OHP in isolierte Chloroplasten aus *Arabidopsis thaliana*

Die Chloroplasten aus *A. thaliana* sind wesentlich weniger stabil als die der Erbse. Die Isolation intakter Chloroplasten muss daher über die Präparation der Protoplasten erfolgen (vgl. 2.3.19). In Abbildung 3.44 ist ein solcher Importversuch gezeigt. Es ergibt sich dasselbe Bild wie für den Import in Erbsenchloroplasten. Zwischen den mit Thermolysin verdauten und den unbehandelten Chloroplasten ist kein Unterschied zu erkennen und auch im Vergleich zum denaturierten OHP, von dem hier 1 μg als Kontrolle aufgetragen ist, kann kein Hinweis auf Prozessierung gefunden werden. Die Tatsache, dass das Bandenmuster immer das gleiche ist, bestätigt die Vermutung, die schon für den Import in die Erbsenthylakoide aufgestellt worden ist: das Protein scheint nicht importiert zu werden, es könnte außerhalb der Chloroplasten an deren äußeren Membran als unspezifische Aggregate vorliegen und wäre aus diesem Grund vor dem Abbau durch die Protease geschützt. Es wäre jedoch auch denkbar, dass dennoch ein sehr geringer

Teil des OHPs importiert und in die Thylakoide transportiert wird, dass aber der immunologische Nachweis dafür nicht sensitiv genug ist.

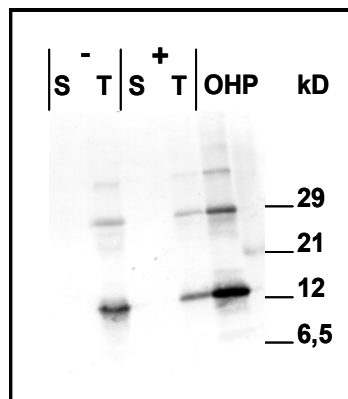


Abb. 3.44: Importversuch von OHP in Chloroplasten aus *A. thaliana*. Die Import-prozedur erfolgte wie unter 2.3.20 beschrieben. S, Stroma; T, Thylakoide; + nach Proteasebehandlung; -, ohne Thermolysin-Verdau. Als Vergleich wurde 1 µg OHP aufgetragen. Der Nachweis des Importes erfolgte über den α-OHP-Antikörper (1:2000).

3.4.5. Insertion von OHP in Erbsenthylakoide

Die Versuche zum Import von OHP in Chloroplasten zeigten keinen Erfolg. Es ist jedoch bekannt, dass das Protein in Chloroplasten importiert und weiter in die Thylakoide transportiert wird (Jansson *et al.*, 2000). Die gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, dass OHP sich in dem gewählten System nicht in isolierte Chloroplasten importieren lässt. Um dennoch den Weg des Proteins in die Thylakoide zu untersuchen, wurde die Importmaschinerie quasi außer Acht gelassen und Experimente zur direkten Insertion in Erbsenthylakoide durchgeführt. LHCP kann erfolgreich in Thylakoide inseriert werden (Kosemund, 1999), daher

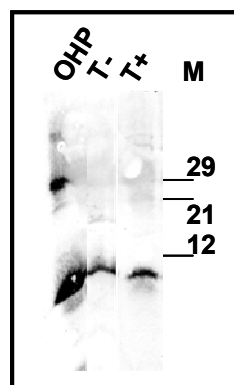


Abb. 3.45: Insertionsversuch von OHP in Erbsenthylakoide. Die Insertionsprozedur erfolgte wie unter 2.3.20 beschrieben. Der Nachweis erfolgte mit dem α-OHP-Antikörper (1:2000), als Vergleich wurde 1 µg OHP aufgetragen. S, Stroma; T, Thylakoide; +, nach Proteasebehandlung; -, ohne Thermolysin-Verdau.

wurde die Insertionsprozedur für OHP daran angelehnt (vgl. 2.3.20). Auch hier erfolgte der Nachweis der Insertion immunologisch. Wie auch beim Import wurden die Thylakoide nach der Insertionsreaktion halbiert und mit - bzw. als Kontrolle ohne - Thermolysin behandelt. In die Membran inseriertes Protein würde gegenüber der Aktion der Protease teilweise unempfindlich sein und im Blot als verkürzte Bande erscheinen. In Abbildung 3.45 ist ein Western Blot nach Insertion von OHP gezeigt. In den Thylakoiden nach Proteasebehandlung ist eine Bande bei

ca. 12 kD zu sehen, sowie eine sehr schwache Bande, die darunter läuft. Diese ist in der Spur der unbehandelten Thylakoide nicht zu sehen. Wenn man jedoch die Bahn betrachtet, in der denaturiertes Protein als Kontrolle aufgetragen ist, erkennt man, dass diese Bande nicht auf die Protease zurückzuführen ist, sondern ein Artefakt darstellt, das auch in der Spur des denaturierten Proteins auftaucht. Es konnte in dem hier verwendeten System kein Hinweis auf Insertion des OHPs in Erbsenthylakoide gefunden werden. Das bedeutet, dass OHP in dem verwendeten System entweder nicht in Erbsenthylakoide inseriert oder aber immunologisch nicht nachgewiesen werden kann.

4. Diskussion

4.1. WSCP – ein wasserlösliches chlorophyllbindendes Protein als Pigment-carrier in der Synthese / Degradation von Chlorophyll?

Das rekombinante wasserlösliche chlorophyllbindende Protein WSCP-his zeigt sowohl zum nativen Protein aus *Brassica oleracea* var. *botrys* als auch zum MBP-WSCP-Fusionsprotein (Satoh *et al.*, 1998) große Ähnlichkeit in Bezug auf spektroskopische Eigenschaften und Pigmentbindung. Aufgrund der Ähnlichkeit zum nativen Protein kann es als geeignetes Werkzeug für Untersuchungen zur Funktion des WSCP herangezogen werden.

4.1.1. WSCP-his faltet sich pigmentabhängig in tetramere Komplexe

WSCP-his kann sowohl aus GuHCl als auch durch Immobilisierung auf einer Nickel-Sepharose Säule rekonstituiert werden und bildet pigmentabhängig Oligomere, die mit dem nativen WSCP komigrieren. Für das native WSCP wurde die Pigmentbindung in einem tetrameren Komplex beschrieben (Satoh *et al.*, 1998), es kann also davon ausgegangen werden, dass WSCP-his nach Rekonstitution ebenfalls in Tetrameren organisiert vorliegt. Für das pigmentierte MBP-WSCP wurden auch andere Organisationsformen wie Di- Tri- und Hexamere beschrieben (Satoh *et al.*, 1998), diese konnten für das rekonstituierte WSCP-his jedoch nicht identifiziert werden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Fusion mit MBP unterschiedliche Assemblierungsformen hervorruft. Andererseits könnten die Oligomere auch instabile Artefakte des MBP-WSCP sein. Das pigmentierte WSCP-his-Tetramer blieb auch nach schwach denaturierender Elektrophorese stabil, während das MBP-WSCP mittels nativer, detergensfreier PAGE und damit unter wesentlich mildereren Trennbedingungen analysiert worden ist (Satoh *et al.*, 1998). Da mittels partiell denaturierender PAGE unspezifisch gebundene Chlorophylle von den stark hydrophoben *Cab*-Proteinen der Thylakoidmembran sehr effizient abgetrennt werden können, kann für das rekonstituierte WSCP-his eine schwache oder unspezifische Bindung freier Chlorophylle ausgeschlossen werden.

4.1.2. Tetrameres WSCP aus Blumenkohl bindet mindestens 2 Chlorophylle

Für WSCP-his wurde eine Stöchiometrie von 2 Chlorophyllen pro Proteintetramer gefunden. Dieses Ergebnis ist konsistent mit dem für das native Protein sowie für MBP-WSCP (vgl. Satoh *et al.*, 1998). Ein homologes WSCP aus *Lepidium virginicum*, das ebenfalls zur Klasse II der „non-photoconvertible“ WSCPs gehört,

weist mit 4 Chlorophyllen pro Tetramer ein höheres Pigment-Protein-Verhältnis auf (Murata & Ishikawa, 1981). Aufgrund seines geringeren Chlorophyll *a/b*-Verhältnisses wird es jedoch einer eigenen Unterklasse zugeordnet (vgl. Satoh *et al.*, 2001). Die Differenz in der Pigmentstöchiometrie der beiden strukturell ähnlichen Proteine kann zum einen damit erklärt werden, dass es sich um Proteine aus zwei verschiedenen Unterklassen handelt, die verschiedene Bindekapazitäten haben. Zum anderen kann der Unterschied aber auch in der experimentellen Methode zur Ermittlung der Stöchiometrien des *Brassica* WSCP begründet liegen. Die Pigmentstöchiometrien wurden nach stringentem Waschen des rekonstituierten Proteins auf der Nickel-Sepharose Säule und anschließender Aufreinigung über ein natives Gel durchgeführt. Es wäre denkbar, dass bei einer theoretischen Stöchiometrie von 4 Chlorophyllen pro WSCP Tetramer zwei Chlorophylle weniger stabil gebunden werden. Das wäre beispielsweise bei einer Bindung dieser zwei Chlorophylle außerhalb der vermuteten Pigmentbindetasche möglich (vgl. 4.1.8). Die Stöchiometrie von zwei Chlorophyllen pro WSCP-Tetramer ist also als unteres Limit anzusehen, eine etwas schonendere Aufreinigung oder die Kristall-Struktur des *Brassica*-WSCP könnten zur genauen Aufklärung der Stöchiometrien beitragen.

4.1.3. Native und rekombinante WSCP-Komplexe haben ähnliche spektroskopische Eigenschaften

Absorptionsspektren von WSCP-his weisen eine deutliche Ähnlichkeit zu denen des nativen Proteins und des MBP-WSCP auf. Aus ihnen lässt sich auf ein relativ hohes Chlorophyll *a/b*-Verhältnis schließen. Dieses variiert für das native WSCP je nach Aufreinigung, die Diversität könnte mit den Standortbedingungen der verwendeten Pflanzen zu tun haben (Satoh *et al.* 1998). Eine habitatbedingte Variation im Chlorophyll *a/b*-Verhältnis wurde ebenfalls für das WSCP aus *Lepidium virginicum* beschrieben (Murata & Ishikawa, 1981). Für Rekonstitutionen mit Chlorophyll b konnte eine Verschiebung der Absorptions- und Excitationspektren in den grünen Spektralbereich beobachtet werden. Das spricht für eine Bindung von Chlorophyll b im Komplex, die, wie CD- und Fluoreszenzmessungen zeigen, eine ähnliche Kopplung der Pigmente möglich macht, wie es bei Chlorophyll a der Fall ist.

Energietransfer-Messungen wurden nach selektiver Anregung von Chlorophyll b durchgeführt. Beim Vergleich der Chlorophyll a- Fluoreszenz der Proben zeigten sich detergensabhängige Unterschiede. In 0,1% LM ist der Energietransfer von Chlorophyll b nach a unvollständig. In detergensfreien Gradienten sind die Spektren von nativem WSCP und rekombinantem Protein, das mit Chlorophyll a oder Totalpigment rekonstituiert wurde, sehr ähnlich. Es konnte ein signifikanter Energietransfer gemessen werden. Eine Kontroll-Rekonstitution ohne Protein ist in diesem System mangels Detergens nicht praktikabel. Wie aber lässt sich nun

erklären, dass in WSCP-Komplexen mit Detergens ein unvollständiger, in Komplexen in wässriger Lösung aber ein vollständiger Energietransfer stattfindet? Es wäre denkbar, dass durch das Detergens die Komplexe gelockert werden, indem es zu Interaktionen mit dem hydrophoben Pigment oder hydrophoben Bereichen innerhalb des Proteins kommt. Würde das Detergens in die Komplexe eindringen, könnte der Abstand der Chlorophylle zueinander vergrößert werden. Eine Vergrößerung des Abstandes bzw. eine detergensbedingte Konformationsvariation könnte den Energietransfer unterbinden. Da der WSCP-Komplex eine recht hohe Stabilität aufweist, könnte man vermuten, dass in Detergensumgebung zwar der Energietransfer teilweise unterbunden, nicht aber die Stabilität beeinflusst wird. Die im Komplex befindlichen Pigmente könnten unvollständig excitonisch gekoppelt vorliegen, oder nicht alle durch das Protein optimal zueinander ausgerichtet sein. Die CD-Spektren von WSCP in 0,1% LM und ohne Detergens gleichen sich jedoch sehr, was bedeutet, dass die excitonischen Interaktionen durch die Detergensumgebung nicht beeinflusst werden (vgl. nachfolgender Absatz). Es wäre außerdem möglich, dass in Detergensumgebung eine vollständige Abtrennung von freiem Pigment nicht mehr gewährleistet ist. Dieser Vermutung könnte durch vergleichende Pigment-Protein-Stöchiometrien der WSCP-Komplexe in Umgebung mit und ohne Detergens nachgegangen werden.

Zwei Chlorophylle pro WSCP-Tetramer sind eine relativ geringe Anzahl für ein chlorophyllbindendes Protein. Das schließt aber dennoch nicht aus, dass die Pigmente excitonische Wechselwirkungen miteinander eingehen. Nachdem je nach Umgebungsbedingungen ein partieller oder ein vollständiger Energietransfer gemessen wurde, konnte durch CD-Spektroskopie auch eine excitonische Kopplung der Pigmente bestätigt werden. Auch hier gleichen sich die Spektren des nativen und des mit Chlorophyll a rekonstituierten WSCP-his sehr, weshalb man annehmen kann, dass die Pigmente relativ zueinander in sehr ähnlicher räumlicher Anordnung gebunden vorliegen. Außerdem sind Übereinstimmungen zu dem von Tabata und Mitarbeitern (1983) gemessenen CD-Spektrum eines nativen *Lepidium*-WSCPs festzustellen. Die Spektren beider Proteine unterscheiden sich im Wesentlichen nur in einem Minimum bei 470 nm (*Lepidium*), welches beim *Brassica*-WSCP nicht auftritt und auf den höheren Chlorophyll b- Gehalt des *Lepidium*-WSCPs zurückzuführen ist (Tabata *et al.*, 1983). Mit Chlorophyll b rekonstituierte Komplexe haben ein ähnliches CD-Spektrum, die Peaks um 670 nm sind jedoch in den blauen, die um 445 nm in den roten Spektralbereich verschoben. Diese Verschiebung ist konsistent mit dem Absorptionsspektrum von Chlorophyll b. Daraus lässt sich schließen, dass Chlorophyll b im WSCP-Komplex in sehr ähnlicher Weise gebunden wird, wie es für Chlorophyll a der Fall ist.

4.1.4. WSCP bindet keine Carotinoide, ist aber photostabil

In Rekonstitutionsversuchen des rekombinanten WSCP mit verschiedenen Pigmentangeboten konnte gezeigt werden, dass sowohl Chlorophyll a als auch Chlorophyll b, jedoch keine Carotinoide im Komplex gebunden werden. WSCP unterscheidet sich in diesem wesentlichen Punkt von allen chlorophyllbindenden Proteinen des Lichtsammelapparates oder des photosynthetischen Reaktionszentrums. Die Carotinoide spielen eine große Rolle im Schutz gegen photooxidativen Stress (Niyogi *et al.*, 1997; zur Übersicht vgl. auch Müller *et al.*, 2001). Im Zusammenhang mit der nichtphotochemischen Fluoreszenzlöschung (NPQ, non-photochemical quenching) dienen sie als Akzeptoren für überschüssige Anregungsenergie, die von Triplett-Chlorophyll auf sie übertragen wird, um dann als Wärme freigesetzt zu werden. Ohne die Carotinoide würde die Energie der Triplett-Chlorophylle auf Sauerstoffmoleküle übertragen werden, es entstünde der chemisch reaktive Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$). Wie Versuche zur Photostabilität zeigten, war an WSCP gebundenes Chlorophyll jedoch auch ohne die Gegenwart von Carotinoiden im Hinblick auf das Ausbleichen wesentlich unempfindlicher als freies Chlorophyll gleicher Konzentration in derselben Umgebung. Das Protein WSCP scheint den gebundenen Pigmenten also eine Art Schutz gegen Photooxidation zu bieten.

4.1.5. WSCP ist ein thermostabiles Protein

Da für WSCPs aus *Chenopodium* und Rosenkohl eine bemerkenswerte Thermostabilität beschrieben worden ist (Oku *et al.*, 1972; Kamimura *et al.*, 1997), wurde WSCP nicht nur auf Photostabilität, sondern auch auf Thermostabilität hin untersucht. Es stellte sich heraus, dass es auch bei Temperaturen um 80°C stabil blieb und sogar einem Erhitzen auf 100°C für kurze Zeit standhielt. Die Ergebnisse zur Stabilität des WSCP passen zu der möglichen Rolle eines hypothetischen Pigmentcarriers, der Chlorophylle oder deren Derivate in Stress-Situationen zu Orten des Abbaus transportiert.

4.1.6. WSCP löscht die Bildung von Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$)

Mittels Spin-Trap EPR wurde näher untersucht, ob das WSCP die gebundenen Chlorophylle so stabilisiert, dass kein $^1\text{O}_2$ mehr gebildet werden kann. Wenn Chlorophyll an WSCP gebunden vorlag, entstanden bei Belichtung wesentlich geringere Mengen an $^1\text{O}_2$, als bei Chlorophyll allein. Ein genereller Löscheffekt durch Proteine kann ausgeschlossen werden, da eine Kontrolle mit BSA als Proteinkomponente nur einen marginalen Unterschied zur $^1\text{O}_2$ -Produktion in der Probe mit freiem Chlorophyll ausmachte. Über einen längeren Zeitraum und bei

Bestrahlung mit Starklicht ist allerdings ein gewisser genereller Effekt von Proteinen nicht auszuschließen. Es kann aber gesagt werden, dass WSCP gebundenes Chlorophyll vor Produktion von Singulett-Sauerstoff und damit vor photooxidativem Schaden zu schützen vermag. Dieses Phänomen kann unterschiedliche Gründe haben.

(1) Im WSCP-Komplex könnte durch einen strukturellen Effekt wie beispielsweise Wärmerelaxation, der interne Konversion beschleunigt, die Lebenszeit des Singulettzustandes von Chlorophyll a verkürzt sein. Solch eine Art von Effekt wird auch für Lichtsammelkomplexe des PS II im Zusammenhang mit dem NPQ diskutiert (Niyogi *et al.*, 1999).

(2) Die intrinsische Lebenszeit des Triplett-Chlorophylls ohne „Quencher“ könnte durch die Proteinumgebung derart verkürzt sein, dass die Wahrscheinlichkeit einer Reaktion mit O₂ geringer wird. In Abwesenheit von O₂ hat das P₇₀₀-Triplett eine Lebenszeit von ca. 6 µs im Vergleich zu 1 ms für freies Chlorophyll (Brettel & Sétif, 1987).

(3) Einige Komponenten des WSCP-Komplexes könnten entweder Triplett-Chlorophyll oder Singulett-Sauerstoff löschen und somit die Rolle der Carotinoide in anderen Chlorophyll-Protein-Komplexen übernehmen.

(4) Eine strukturelle Veränderung bei der Chlorophyllbindung, wie beispielsweise die pigmentinduzierte Tetramerisierung, könnte dafür verantwortlich sein, dass Sauerstoff sterisch daran gehindert wird, in räumliche Nähe der Chlorophyll-Bindestelle zu gelangen.

Zeitaufgelöste Spektroskopie könnte helfen, mehr über die Lebenszeiten von angeregten Chlorophyll-Zuständen zu erfahren und dann zwischen den genannten Möglichkeiten für die geringe ¹O₂-Produktion zu unterscheiden. Die Histidine des His-Tags üben keinen wie für Imidazol beschriebenen Löscheffekt auf das ¹O₂ aus, da das EPR-Signal des rekonstituierten WSCP-his sich nicht vom nativen WSCP unterscheidet.

Der Fall eines chlorophyllbindenden Pflanzenproteins ohne zusätzlich gebundene Carotinoide ist bislang einmalig. Erst kürzlich wurde gefunden, dass Cytochrom b₆/f ein Chlorophyll-Molekül enthält, dessen Funktion noch unklar ist. Dieses Chlorophyll wird jedoch durch substöchiometrische Carotinoidmengen begleitet (Pierre *et al.*, 1997). Da Cytochrom b₆/f ein Dimer bildet, könnte ein Carotinoid-Molekül für den Schutz von 2 Chlorophyllen verantwortlich sein.

4.1.7. Rekombinantes WSCP bindet Chlorophyll-Vorstufen und Abbau- produkte

Um Informationen darüber zu erhalten, welche strukturellen Bestandteile des Chlorophyllmoleküls für seine Interaktion mit dem WSCP essentiell sind, wurden Rekonstitutionsversuche mit verschiedenen Chlorophyll-Derivaten durchgeführt.

Wie auch schon von Satoh und Mitarbeitern (1998) beschrieben, wurde Chlorophyll b mit in etwa derselben Effizienz wie Chlorophyll a in den WSCP-Komplex gebunden. Auch in LHC IIb wurden einige Bindestellen beschrieben, die annähernd gleiche Affinitäten zu entweder Chlorophyll a oder b aufweisen (Hobe *et al.*, 2003). Bakteriochlorophyll a, was nicht in den LHC IIb gebunden wird, (Paulsen *et al.*, 1991) wird im Gegensatz dazu im WSCP als Ligand akzeptiert. Bakteriochlorophyll a unterscheidet sich durch verschiedene Seitengruppen in der Peripherie des Tetrapyrrolringes und durch eine gesättigte C-C-Bindung im Ring B von Chlorophyll a, das an dieser Stelle eine Doppelbindung aufweist. Dieser Unterschied führt zu einer anderen Verteilung der Pi-Elektronen über das mesomere System von Chlorophyll a bzw. Bakteriochlorophyll a. Da die erwähnten strukturellen Unterschiede für die Chlorophyll-Bindung in den WSCP-Komplex keine Rolle zu spielen scheinen, scheint die Erkennung des Pigmentes im Hinblick auf die Detailstruktur des Tetrapyrrolringes wenig selektiv zu sein. Genauere Aussage über die Bedeutung der Detailstruktur können durch die hier verwendeten Pigmentderivate jedoch nicht gemacht werden.

Bei Rekonstitution mit Chlorophyllid a und b, Zn-Phäophorbid a sowie Mg-Protoporphyrin IX war ebenfalls eine Pigmentbindung detektierbar, jedoch erfolgte keine pigmentabhängige Tetramerisierung. Der Phytolrest scheint also bei der pigmentinduzierten Oligomerisierung eine Rolle zu spielen (vgl. 4.1.8.). Um eine Bindung von Chlorophyll-Derivaten ohne Phytolrest zu ermöglichen, muss eine Wechselwirkung des Proteins mit Pigmenten aber außer am Phytolrest noch am Tetrapyrrolring möglich sein. Eine wichtige Bedeutung kommt hier dem Zentralatom zu: es konnte gezeigt werden, dass Chlorophyll-Derivate ohne Zentralatom nicht gebunden werden konnten. Dasselbe gilt für Derivate, in denen Mg^{2+} durch Cu^{2+} substituiert worden war. Pigmente mit Zn^{2+} als Zentralatom wurden dagegen als Ligand akzeptiert. Das Zentralatom in Zn-Phäophytin a ist sterisch ähnlich in den Tetrapyrrolring integriert, als es bei Chlorophyll a und Mg^{2+} der Fall ist (Helfrich & Rüdiger, 1992). Cu-Phäophytin a dagegen weist eine planarere Geometrie auf, die möglicherweise eine Bindung an WSCP verhindert. Auch für die Rekonstitution von LHC IIb mit verschiedenen Metallo-Phäophytinen a wurde beobachtet, dass Zn-Phäophytin a, nicht aber Cu-Phäophytin a, Chlorophyll a ersetzen kann (Diplomarbeit C. Eisen, 1991).

WSCP bindet Chlorophyllid a und b, bei der Rekonstitution mit Zn-7¹OH-Phäophorbid a konnte jedoch keinerlei Pigmentbindung detektiert werden. Mg-7¹OH-Phäophytin a (oder 7¹OH-Chlorophyll a) ist das Zwischenprodukt der reversiblen Umsetzung von Chlorophyll a zu Chlorophyll b. Bei dieser auch als Chlorophyllzyklus bezeichneten Reaktion des Biosynthese- und Abbaufweges wird die Methylgruppe von Chlorophyll a am C(7) des Ringes B über eine Hydroxylgruppe zur Formylgruppe von Chlorophyll b oxidiert (Tanaka, 1998; zur Übersicht vgl. Hörtensteiner, 1999). Das Ergebnis, dass Zn-7¹OH-Phäophorbid

nicht an WSCP bindet, ist jedoch erstaunlich, da es nur einen sehr geringen Unterschied zu Chlorophyll a oder b aufweist. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass es sich bei dem Komplex mit Zn-7¹OH-Phäophorbid um ein konzentrationsbedingtes, instabileres Artefakt handeln könnte. Um zu untersuchen, ob 7¹OH-Phäophorbid a nicht oder nur wesentlich schwächer gebunden wird, als die Chlorophyllide und Mg-Protoporphyrin IX, müsste die Rekonstitution von WSCP-his mit 7¹OH-Phäophorbid a wiederholt und gegebenenfalls unter milderen Bedingungen analysiert werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass an C(7) am Ring B eine relativ spezifische Pigmentbindestelle liegt, die auch schon kleine Veränderungen nicht mehr akzeptiert. Die Tatsache, dass in näherer Umgebung dazu, an Ring A, jedoch für Bakteriochlorophyll a ein weitaus größerer struktureller Unterschied keine Rolle zu spielen scheint, macht diese Vermutung nicht wahrscheinlich. In jedem Fall sind an dieser Stelle weiterführende Untersuchungen sinnvoll.

Für die Pigmentbindung des WSCP kann der Tetrapyrrolring in verschiedener Weise von Bedeutung sein:

(1) Chlorophylle und deren Derivate mit Phytolrest könnten über eine zusätzliche Bindestelle an letzterem in den WSCP-Komplex gebunden werden. Die Detailstruktur des Tetrapyrrols wäre für diese Pigmente somit weniger relevant für eine stabile Bindung, als es bei Derivaten ohne Phytol der Fall wäre. Der Phytolrest wäre dann allein für die Oligomerisierung des WSCP-Komplexes verantwortlich. Zur Annäherung an diese Vermutung wären Rekonstitutionsversuche mit 7¹OH-Chlorophyll nötig.

(2) Zusätzlich zum Zentralatom könnte eine Wechselwirkung zwischen Pigment und Protein in der Nähe des 7¹-C-Atomes an Ring B stattfinden. Chlorophyllide und Derivate ohne Phytolrest wären nach obiger Vermutung weniger stabil gebunden und somit könnten Veränderungen in der Detailstruktur, wie im Intermediat zwischen Chlorophyll a und b, eine Schwächung der Bindung hervorrufen. Für die Pigmentbindung im WSCP-Komplex scheinen die strukturellen Veränderungen in der Peripherie des Tetrapyrrolringes eine noch nicht vollständig geklärte Rolle zu spielen. Dahingegen zeigen die Experimente, dass dem zentralen Metallatom eine große Bedeutung zukommt, da weder Phäophytin noch Bakteriophäophytin als Ligand in Frage kommen.

4.1.8. Die Rolle des Phytolrestes in der Oligomerisierung und Vermutungen zum Aufbau des WSCP-Komplexes

Es konnte gezeigt werden, dass Oligomerisierung zum WSCP-Komplex nur mit Pigmenten stattfinden kann, die einen Phytolrest aufweisen. Dieser hydrophobe Teil des Chlorophylls könnte also für die Stabilität der Komplexe verantwortlich sein. Wie aber kann man sich die Zusammensetzung eines WSCP-Komplexes

vorstellen? In Abbildung 4.1 ist ein hypothetischer Aufbau eines WSCP-Tetramers dargestellt. Es wäre denkbar, dass sich zwei Monomere zusammenfinden und die Pigmente über das Zentralatom und/oder den Tetrapyrrolring mit Bindestellen in einer Art Pigment-Tasche wechselwirken. Bei diesem Szenario wäre ein Dimer ein denkbare Zwischenprodukt auf dem Weg zum tetrameren Komplex. Dieses Dimer wäre jedoch im Stroma nicht denkbar, da der hydrophobe Phytolrest aus der Pigment-Tasche herausragen würde. Außerdem wären dann auch in Detergensumgebung Dimere zu erwarten, was jedoch nicht bestätigt werden konnte.

Dennoch wäre eine Dimerisierung unter anderen Bedingungen denkbar. Wie schon erwähnt (vgl. 4.1.2.), bindet das WSCP-Tetramer mindestens 2 Chlorophylle, möglicherweise werden jedoch 2 zusätzlich etwas weniger stabil gebunden. Wenn es sich bei WSCP jedoch tatsächlich um ein Transportmolekül handelte, könnten sich zwei Dimere mit je einem gebundenen Chlorophyll-Molekül an der Thylakoidmembran befinden und durch den Zusammenschluss zum Tetramer zwei weitere Chlorophylle aus der Membran entfernen. Die Dimere wären dann ein wichtiges Intermediat im Entfernen von Pigmenten von oder ihrem Transport zu der Thylakoidmembran. Aufschluss über diese Theorie könnte der Versuch einer schonenden Isolierung eines solchen möglichen Zwischenproduktes bringen sowie die Kristallstruktur des WSCP aus Blumenkohl. Letztere würde auch die Frage nach der Anzahl der im WSCP gebundenen Chlorophyll-Moleküle eindeutig klären. Im *Lepidium* WSCP-Komplex sind 4 Chlorophylle pro Tetramer gebunden, also eines pro monomerer Untereinheit (Murata & Ishikawa, 1981). Im Unterschied dazu wäre denkbar, dass mögliche Pigmenttaschen im *Brassica* WSCP-Komplex anders ausgebildet sind, so dass die Bindung von nur 2 Chlorophyllen möglich ist.

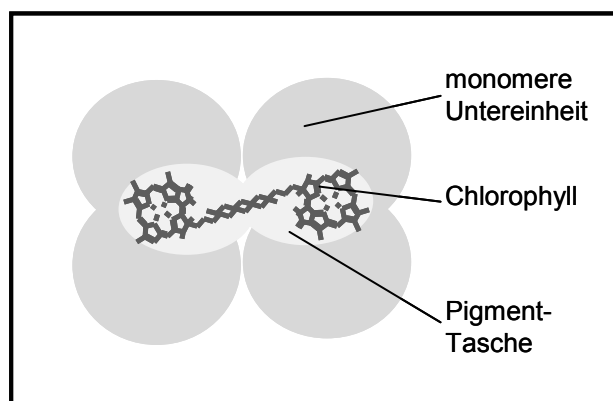


Abb. 4.1: Hypothetischer Aufbau eines tetrameren WSCP-Komplexes.

Pigmente ohne Phytolrest verursachen keine Oligomerisierung. Sie binden an das monomere Protein, jedoch scheint diese Bindung instabiler zu sein, als es bei Pigmenten mit Phytolrest der Fall ist. Die hypothetische Stöchiometrie von Pigmenten ohne Phytolrest wäre eines pro WSCP-Monomer. Nimmt man aber an, dass die Wechselwirkung von Chlorophyllid etc. mit dem Protein genau wie beim

Chlorophyll o.ä. über das Zentralatom stattfindet, so sind zwei Chlorophylle pro Tetramer eher unwahrscheinlich. Entweder muss also die Bindung von Chlorophyllen und Chlorophylliden unterschiedlich sein oder es werden tatsächlich, wie oben schon diskutiert, 4 Chlorophylle pro Tetramer gebunden, davon aber zwei weniger stabil. Es lässt sich wiederum vermuten, dass außer dem Zentralatom noch eine Wechselwirkung mit dem Phytolrest geschieht, für die zwei Monomere Untereinheiten nötig sind. Das wasserlösliche WSCP weist keine großen hydrophoben Bereiche auf, weshalb ein Monomer zur Ausbildung einer Pigmenttasche evtl. nicht ausreichen würde.

4.1.9. Spielt WSCP eine Rolle als Pigmenttransportprotein im Chlorophyllstoffwechsel?

Über die Funktion des WSCP ist noch nichts bekannt. Da das Protein ein Sequenzmotiv der Proteinaseinhibitoren vom Kunitz-Typ aufweist, wurde angenommen, es könne eine solche Aktivität besitzen. Es stellte sich jedoch heraus, dass es keinen Einfluss auf Trypsin hat, das jedoch von einem anderen Kunitz-Typ Inhibitor gehemmt werden kann (Ilami *et al.*, 1997; Nishio & Satoh, 1997). WSCP weist eine hohe Sequenzähnlichkeit zu Proteinen auf, die durch Trockenstress induziert werden (Annamalai & Yanagihara, 1999). Für ein WSCP-ähnliches Protein in Raps, BnD22, wurde diskutiert, dass es bei der Verringerung der Proteaseaktivität in trockenadaptierten Blättern und somit in der Verzögerung der Blattseneszenz eine Rolle spielt (Ilami *et al.*, 1997).

Da es sich bei WSCP um ein wasserlösliches Protein handelt, das Chlorophylle bindet, wäre eine weitere Theorie zur Funktion dieses Proteins, dass es gebundene Chlorophylle durch hydrophile Kompartimente wie das Stroma transportiert. Es könnte als Transportprotein beim ersten Schritt des Chlorophyll-Abbaus, der Entfernung der Chlorophylle aus der Thylakoidmembran, eine Rolle spielen (Kamimura *et al.*, 1997; Murata *et al.*, 1981). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das rekombinante WSCP aus Blumenkohl nicht nur Chlorophyll sondern auch einige Derivate bindet. Darunter ist beispielsweise Chlorophyllid, welches als Substrat der Chlorophyll-Synthase sowohl ein Intermediat der Chlorophyllsynthese darstellt, als auch ein Abbauprodukt nach der Dephytylierung durch die Chlorophyllase. Letztere wird in der Chloroplasten-Hüllmembran vermutet (Matile *et al.*, 1997). Ein Chlorophyllmolekül müsste also zu Beginn des Degradationsweges zunächst von der Thylakoidmembran durch das Stroma zur Hüllmembran transportiert werden. Aufgrund seiner Hydrophobizität benötigt es dazu eine Art Carrier. Hörtensteiner (1999) vermutet, dass es sich bei WSCP um diesen bislang unbekanntes „Faktor X“ handeln könnte. Eine weitere Rolle im Degradationsweg von Chlorophyll kann jedoch ausgeschlossen werden, da spätere Abbauprodukte wie beispielsweise Phäophorbid nicht an das WSCP gebunden

werden. Wenn WSCP als „Faktor X“ im Stroma Chlorophyll transportieren könnte, wäre es auch denkbar, dass es im Chlorophyll-Syntheseweg eine ähnliche Rolle spielt. Es könnte Chlorophyllid in die entgegengesetzte Richtung, also von der Chloroplasten-Hülle zur Thylakoidmembran, transportieren, wo die Chlorophyll-Synthase seine Phytylierung zum Chlorophyll bewirkt. Da WSCP aber auch Mg-Protoporphyrin IX, ein früheres Intermediat der Chlorophyll-Synthese, zu binden vermag, ist auch eine übergreifende Funktion in diesem Syntheseweg nicht auszuschließen. Genau wie der Abbau ist auch die Synthese des Chlorophylls auf mehrere Kompartimente verteilt. Die frühen Schritte bis zur Synthese von Protoporphyrinogen finden im Stroma statt, alle weiteren Reaktionen bis zum Chlorophyllid a werden von Enzymen katalysiert, die an die Chloroplastenmembran gebunden oder mit ihr assoziiert sind (Reinbothe & Reinbothe, 1996; vgl. auch 1.2.) WSCP könnte als Carrier magnesiumhaltiger Chlorophyll-Vorläufer zwischen den Enzymen fungieren und außerdem als Transporter zwischen den Kompartimenten des Chlorophyllstoffwechsels dienen. Mittels Rekonstitutionsexperimenten mit verschiedenen anderen Vorläufermolekülen könnte die Funktion im Syntheseweg genauer geklärt werden. Genauere Lokalisation des WSCP im Stroma oder evtl. am Chloroplasten-Envelope wäre auch ein wichtiger Hinweis zur Überprüfung dieser Theorie. Auch „knock-out-“ oder antisense- Mutanten, denen das WSCP fehlt, könnten einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung seiner Funktion leisten.

4.2. PsbS – ein transient pigmentbindendes Protein?

Die hydrophobe S-Untereinheit des Photosystems II mit vier Transmembranhelices, das PsbS-Protein, weist Sequenzhomologien zum LHC II auf. Es wurde erstmals in Spinat-Thylakoiden entdeckt und wurde nach Aufreinigung über milde SDS-PAGE sowie Identifikation mittels Western-Blot als pigmentiertes CP22 bezeichnet (Funk *et al.*, 1994). Es konnte wenig später in einem nativeren Zustand mit Pigmenten isoliert werden (Funk, *et al.*, 1995a). PsbS ist in etiolierten Keimlingen auch ohne Pigmente stabil, es wird nicht von Proteasen abgebaut. Daher wird ihm eine Funktion als transientser Pigmentcarrier zugeschrieben (Funk, *et al.*, 1995b). In dieser Arbeit wurde die Pigmentbindung des PsbS im Hinblick auf seine mögliche Funktion näher untersucht.

4.2.1. Pigmentierte PsbS-Rekonstitutionsprodukte lassen sich über Saccharosedichtegradienten aufreinigen

Für das PsbS wurden Rekonstitutionsversuche mit verschiedenen Pigmentzusammensetzungen unternommen. Zur Auftrennung möglicher Rekonstitutions-

produkte erwies sich das schwach denaturierende Deriphat-Gel als ungeeignet. Natives PsbS aus Spinat-Thylakoiden war jedoch zuvor über eine weniger milde, schwach denaturierende SDS-PAGE in einer pigmentierten Bande aufgereinigt worden (Funk *et al.*, 1994). Ein Grund dafür, dass die Rekonstitution unter den verwendeten Bedingungen erfolglos war, könnte sein, dass die gewählten Methoden zur Rekonstitution und zur Aufreinigung der Rekonstitutionsprodukte nicht geeignet waren. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden für die Rekonstitution des PsbS in dieser Arbeit mehrere unterschiedliche Methoden getestet, die im Gelsystem alle keinen Hinweis auf Rekonstitution ergaben. Es könnte sich also entweder um einen generellen Effekt bei der Rekonstitution handeln oder um eine Wechselwirkung von Pigment und Protein, die zu schwach ist, um im Gelsystem entdeckt werden zu können. Im Gegensatz zum Deriphat-Gel konnten nach Optimierung der Trennbedingungen für das PsbS über die etwas schonendere Saccharosedichtegradientenzentrifugation pigmentierte Banden nachgewiesen werden. Im Kontrollgradienten ohne Protein existierte keine entsprechende Bande auf derselben Höhe. Die Bedingungen im Deriphat-Gel schienen also zu stringent zu sein, um eine möglicherweise transiente Pigmentbindung nachweisen zu können. Da FITC-markiertes, nicht rekonstituiertes PsbS im Gradienten etwas höher läuft als pigmentiertes PsbS, kann Kolo-kalisation weitgehend ausgeschlossen werden. Es kann also gesagt werden, dass es sich bei der pigmentierten Gradientenbande um ein pigmentabhängiges Rekonstitutionsprodukt des PsbS handelt. Dieses diente als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen.

Frühere Versuche, PsbS-Rekonstitutionsprodukte nach IEF über einen Saccharosedichtegradienten mit 0,3% LM aufzureinigen (Dominici *et al.*, 2002) ergaben die Aufreinigung von unpigmentiertem PsbS. Das könnte an den vergleichsweise stringenten Trennbedingungen liegen. Die Zentrifugation erfolgte in weit höherer Detergengkonzentration, als für die Auftrennung von PsbS in dieser Arbeit verwendet wurde (0,1% LM). Diese harscheren Bedingungen könnten die Ursache dafür sein, dass in dem von Dominici und Mitarbeitern verwendeten System keine Pigmente am PsbS mehr detektiert werden konnten. Außerdem wurden recht hohe Salzkonzentrationen (>1M NaCl) zugesetzt, die sich evtl. störend auf die Trennung auswirken könnten. Da die Auftrennung über Dichtegradienten eine relativ milde Methode ist, können unspezifische Interaktionen von Pigmenten jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Um dies zu überprüfen, wurden Pigment-Protein-Stöchiometrien bestimmt.

4.2.2. Pigment-Protein-Stöchiometrien von rekonstituiertem rekombinantem PsbS im Vergleich zum nativen Protein

Das rekombinante PsbS-Rekonstitutionsprodukt wurde auf seine Pigment-Protein-Stöchiometrien hin untersucht. Pigmente wurden mit 2-Butanol extrahiert und über

HPLC quantifiziert. Die Proteinmenge wurde über den CBQCA-Assay bestimmt. Es ergaben sich Werte von 3 Chlorophyllen und 1,1-3,2 Carotinoiden pro Protein bei einem Chlorophyll a/b-Verhältnis von 3,8 und einem Chlorophyll/Carotinoidverhältnis von 1,6. Für das native PsbS wurden 5 Chlorophylle und ein Carotinoid pro Protein beschrieben (Funk *et al.*, 1995a). Das Chlorophyll a/b-Verhältnis des nativen Proteins beträgt 6, das Chlorophyll- zu Carotinoidverhältnis 4,9. Der größte Unterschied zwischen rekombinantem und nativem PsbS liegt im Chlorophyll- zu Carotinoidverhältnis, das für das rekombinante PsbS mit 1,6 sehr viel geringer ist als für das native Protein mit 4,9, und in den schwankenden Carotinoidwerten. Für die Unterschiede in den Stöchiometrien könnte es mehrere Gründe geben:

(1) Vor dem Hintergrund, dass es sich bei PsbS vermutlich um einen transienten Pigmentcarrier handeln könnte (zur Übersicht, vgl. Funk, 2001), könnte die Isolation bzw. Aufreinigung pigmentierter nativer oder rekombinanter Komplexe stark von den gewählten Bedingungen abhängig sein. Unter mildereren Bedingungen wären dann Pigmentmoleküle fester mit dem Protein assoziiert, als unter stringenteren Bedingungen, die letztendlich auch zur völligen Dissoziation der transient gebundenen Pigmente führen könnten.

(2) Ein möglicher Grund für die Abweichung im Chlorophyll- zu Proteinverhältnis zwischen nativem und rekombinantem PsbS könnte auch in der Methode zur Proteinbestimmung liegen. Methoden, die auf der Absorption von aromatischen Aminosäuren wie Tryptophan und Tyrosin bei 280 nm basieren sowie die BCA-Methode, die auf der Reaktion von Tryptophan, Tyrosin und Cystein mit Kupfer-Ionen beruht, konnten zur Quantifizierung des PsbS nicht herangezogen werden, da von den genannten Aminosäuren nur ein Tyrosin vorhanden ist. Auch der für das native PsbS verwendete Lowry-Assay basiert auf der Interaktion mit Kupfer-Ionen. Das könnte eine Ursache für etwas höhere Chlorophyll- zu Protein-Werte beim nativen PsbS sein. In dieser Arbeit wurde PsbS mit dem CBQCA-Assay quantifiziert. Diese sensitive Methode erlaubt eine Bestimmung der Proteinmenge über die zugänglichen Amine. Wegen zu hoher Verluste bei Proteinfällungen wurden die Pigmente nicht aus dem Ansatz entfernt, was ebenfalls eine Fehlerquelle darstellt. Die Detektion des Proteins erfolgte jedoch über die Fluoreszenzemission des Endproduktes um 530 nm, also in der Grünlücke. Aus diesem Grund kann der Fehler als relativ gering eingestuft werden.

(3) Es kann nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden, dass unspezifische Interaktionen von Pigmenten mit Protein auch zu den Unterschieden in der Stöchiometrie beitragen, da das stark hydrophobe Protein unter relativ milden Bedingungen isoliert wurde und auch ohne Pigmente stabil ist, also zu einem gewissen Grad gefaltet sein muss (Funk *et al.*, 1995b).

4.2.3. PsbS-Rekonstitutionsprodukte zeigen pigmentabhängig erhöhte Helixanteile, nicht aber excitonische Wechselwirkung der Pigmente

Spektroskopische Untersuchungen sollten Aussagen über die Art der Pigmentbindung am PsbS erleichtern. Rekonstituiertes PsbS zeigte kein signifikant verändertes Absorptionsverhalten als das angebotene oder das am Protein gebundene Pigment ohne Protein. Auch in einer früheren Untersuchung mit nativem PsbS wurde über ein ähnliches Ergebnis berichtet (Dominici *et al.* 2002). Der Unterschied lag allerdings in der Negativkontrolle, die aus derselben diffusen Proteinbande aus dem Bereich genommen wurde, der kein Protein enthielt. Aus diesem Ergebnis wurde die Vermutung aufgestellt, es handle sich nicht um eine Pigmentbindung. Bei näherer Betrachtung der Aufreinigungsprozedur muss jedoch die Möglichkeit angemerkt werden, dass schwach wechselwirkende Pigmente unter den verwendeten Bedingungen vom Protein abdissoziieren konnten. Eine transiente und schwache Pigmentbindung kann so also weder nachgewiesen noch ausgeschlossen werden. Allerdings bleibt hier die Frage offen, welche Kriterien ein transients Pigmentcarrier bezüglich der Pigmentbindung erfüllen muss, d.h., ob Veränderungen in der Absorption wirklich ein Merkmal für eine vorübergehende Bindung von Pigmenten an ein Protein sein können.

Mittels Absorptionsmessung bei 77K können unterschiedliche Absorptionsformen eines Pigmentes sichtbar gemacht werden, die durch die Wechselwirkung mit dem Protein entstehen können. Zwischen PsbS-Rekonstitutionsprodukten und Negativkontrollen mit gleichen Pigmentverhältnissen und -mengen zeigte die zweite Ableitung des Spektrums Unterschiede, die auf unterschiedliche Chlorophyll-Absorptionsformen schließen lassen. Aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit dieses Ergebnisses kann jedoch von einer Klärung bezüglich der Spezifität der Pigmentbindung nicht gesprochen werden.

CD-Spektroskopie kann im sichtbaren Spektralbereich Hinweise auf excitonische Wechselwirkungen zwischen Chromophoren liefern. Im UV lassen sich damit Rückschlüsse auf die Art der Sekundärstruktur ziehen. CD-Spektren von aufgereinigten PsbS-Rekonstitutionsprodukten ließen keinerlei Hinweis auf excitonische Wechselwirkungen zu. Dieses Ergebnis ist konsistent mit dem für natives PsbS (Funk *et al.*, 1995a). Im UVCD konnte pigmentabhängig eine etwas stärkere Ausbildung helikaler Struktur beobachtet werden, als in den Kontrollen ohne Pigmentzusatz. Zwar scheint PsbS auch in Abwesenheit von Pigmenten eine gewisse Sekundär- oder Tertiärstruktur auszubilden, die stärkere Helixbildung in Gegenwart von Pigmenten könnte aber dafür sprechen, dass PsbS mit Pigmenten interagiert und die endgültige Ausbildung oder Stabilisierung der Sekundär- oder Tertiärstruktur auslöst. Da es sich jedoch nur um einen leichten Unterschied handelt, kann dieses Ergebnis nur als Unterstützung für diese Vermutung dienen.

Fluoreszenzmessungen sowie Untersuchungen zum Energietransfer ergaben keinen Hinweis auf durch das Protein bedingte Ausrichtung der Pigmente zueinander. Das könnte einerseits wiederum bedeuten, dass es sich um unspezifische Wechselwirkungen handelt. Andererseits wäre aber auch denkbar, dass zwischen den möglicherweise recht locker an das Protein gebundenen Pigmenten entweder durch zu große Entfernung oder durch ungünstige Ausrichtung keine Wechselwirkungen oder Energieweiterleitungen stattfinden können. Um letzteren Punkt zu untersuchen, wurde das PsbS N-terminal mit dem Fluoreszenzfarbstoff TRITC markiert, rekonstituiert, und die aufgereinigten Rekonstitutionsprodukte auf Energietransfer vom Farbstoff auf Chlorophyll a untersucht. Als Positivkontrolle wurde TRITC-markierter LHC II mitgeführt, bei dem ein Energietransfer messbar war. Beim PsbS war dies jedoch nicht der Fall. Mit dem Experiment kann allerdings nur dann eine Aussage gemacht werden, wenn man annimmt, dass der markierte N-Terminus des Proteins beim gefalteten Komplex in der Nähe des gebundenen Chlorophylls lokalisiert ist. Es können also abermals zwei Vermutungen aufgestellt werden: Das Ergebnis könnte bedeuten, dass der N-Terminus zu weit von einem eventuell gebundenen Chlorophyll entfernt liegt. Diese Vermutung ließe sich durch weitere Markierungsexperimente an anderen Stellen des Proteins überprüfen. Es darf jedoch auch eine unspezifische Assoziation der Pigmente mit dem Protein nicht ausgeschlossen werden, die einen Energietransfer nicht zulässt.

4.2.4. PsbS akkumuliert bevorzugt Carotinoide

Durch Rekonstitutionversuche mit unterschiedlichem Pigmentangebot konnte gezeigt werden, dass PsbS bevorzugt Carotinoide akkumuliert. Rekonstitution mit Carotinoiden allein führte zu einer pigmentierten, distinkten Bande im Gradienten. Wurden jedoch nur Chlorophylle und keine Carotinoide in die Rekonstitution eingesetzt, war nur eine sehr schwache, diffuse Bande zu erkennen, die bei näherer Betrachtung der Pigmentzusammensetzung geringe Mengen an β -Carotin enthielt. Es handelt sich dabei vermutlich um eine Verunreinigung, die aber im eingesetzten Pigment nicht detektierbar war. Ungeachtet ihrer Herkunft ist es jedoch bemerkenswert, dass das β -Carotin gerade am PsbS akkumuliert wird. Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung der bevorzugten Bindung von Carotinoiden an das Protein, schließt aufgrund der Hydrophobizität der Proteins jedoch eine unspezifische Wechselwirkung beider Moleküle nicht gänzlich aus. Gegen hydrophobe Interaktionen spricht jedoch das Ergebnis, dass die ebenfalls hydrophoben Chlorophylle nicht vermehrt akkumuliert werden. Eine Präferenz gegenüber einem bestimmten Pigment bzw. einer Pigmentgruppe macht eine unspezifische Wechselwirkung unwahrscheinlicher. Im LHC II dienen Carotinoide der Stabilität des Komplexes, indem sie sich über Kreuz entlang der Helices anlagern (Kühlbrandt *et al.*, 1994). Da die Struktur des PsbS trotz der vierten

Transmembranhelix ähnlich dem des LHC II sein könnte, könnten Carotinoide auch hier eine stabilisierende Aufgabe erfüllen.

Rekonstitutionsexperimente mit variierendem Pigmentangebot („TE 10 X“) zeigten nach Analyse der Pigment-Protein-Stöchiometrien eine verstärkte Akkumulation von Carotinoiden. Im nativen PsbS war Lutein das mengenmäßig am stärksten vertretene Carotinoid (Funk *et al.*, 1995a), das ist am rekombinanten PsbS auch der Fall. Auffällig in allen Versuchen war eine Anreicherung von β -Carotin, das auch immer in der Stöchiometrie von 1:1 am Protein detektiert wurde. Trotz der Möglichkeit der unspezifischen Interaktionen zwischen dem hydrophoben PsbS und den Carotinoiden ist es erstaunlich, dass sich dieses Ergebnis durch alle Versuche zieht. Weitere Untersuchungen wie Wiederholungen dieses Versuchen und beispielsweise eine Rekonstitution mit β -Carotin in großem Überschuss oder als alleiniges Pigment im Angebot könnten weiteren Aufschluss über die Bedeutung dieses Pigmentes in einem möglichen PsbS-Komplex liefern.

4.2.5. PsbS – ein transienter Pigmentcarrier?

Mit den in dieser Arbeit gezeigten Rekonstitutionsversuchen konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob PsbS mit Pigmenten stabile Interaktionen eingeht. Trotz der Homologie zu Mitgliedern der *Cab*-Proteinfamilie werden Pigmente anscheinend nicht in derselben Weise oder unter denselben Bedingungen gebunden, wie es für den LHC II bekannt ist. Trotz des Nachweises einer Assoziation des nativen PsbS mit Pigmenten (Funk *et al.*, 1994, 1995a+b) wurde vermutet, es handele sich nicht um eine spezifische Pigmentbindung (Dominici *et al.*, 2002). Das PsbS ist das einzige pigmentbindende Protein, welches in etiolierten Spinat-Keimlingen auch in Abwesenheit von Chlorophyll stabil ist (Funk *et al.*, 1995b). Es muss folglich strukturelle Eigenschaften aufweisen, wie beispielsweise eine beginnende Sekundär- oder Tertiärstruktur, die es vor dem Abbau schützen. Da PsbS während des Ergrünens in Gegenwart von Chlorophyllen isoliert wurde und bei Belichtung von etiolierten Keimlingen früher präsent ist, als andere chlorophyll-bindende Proteine, wird vermutet, dass es das erste chlorophyllbindende Protein der Pflanze darstellt (Funk *et al.*, 1995b), und als transientes „storage protein“ für Pigmente fungiert (Funk, 2001).

Diese Vermutung kann mit den Daten dieser Arbeit nur bekräftigt, nicht aber eindeutig belegt werden. Für eine transient pigmentbindende Funktion spricht, dass natives PsbS mit Pigmenten isoliert und rekombinantes PsbS nach Rekonstitution mit Pigmenten aufgereinigt wurde. Dagegen spricht, dass die Aufreinigung nur unter milden, d.h. wenig stringenten Bedingungen möglich war. Außerdem waren keine excitonischen Wechselwirkungen zwischen den gebundenen Pigmenten zu erkennen. Bezüglich dieses Aspektes stellt sich jedoch die Frage, ob Pigmente in

einem transienten Pigmentcarrier überhaupt excitonisch gekoppelt sein oder Energietransfer leisten müssen. Es wäre denkbar, dass die spezifische Faltung, die die genaue Ausrichtung der Pigmente verursachen würde, in Bezug auf die Funktion zu aufwendig ist. Ein transients Pigmentcarrier muß evtl. in der Lage sein, die gebundenen Pigmente schnell wieder abzugeben, was nur durch eine lockere Bindung gewährleistet wäre.

Ein weiteres Argument für Wechselwirkungen von PsbS mit Pigmenten könnte die Kristallisation dieses Proteins liefern. Versuche dieser Art zeigten pigmentabhängig die Ausbildung von 2D-Kristallstrukturen (Claudia Büchel, pers. Mitteilung). Bevor allerdings genauere Aussagen über die Proteinstruktur gemacht werden können, ist eine Optimierung der Kristallisationsbedingungen notwendig. Ein 2D-Kristall könnte die fehlende Information über die Pigmentbindung liefern und klären, ob Pigmente stabil gebunden werden können, oder ob sie evtl. eine andere Rolle im Komplex spielen. Da sich Kristallstrukturen nur dann ausbildeten, wenn mit Pigmenten rekonstituiertes PsbS verwendet wurde, trägt dieses Ergebnis dennoch maßgeblich zu der Aussage bei, dass PsbS ein pigmentbindendes Protein sein könnte. Da PsbS auch in Abwesenheit von Pigmenten stabil ist, sich aber nur Kristalle ausbilden, wenn Pigmente im Ansatz vorhanden sind, müssen diese einen Einfluss auf die Tertiärstruktur haben. Da Kristalle nur aus regelmäßigen Strukturen entstehen, wäre es denkbar, dass die Fertigstellung bzw. Stabilisierung der Tertiärstruktur des PsbS durch Pigmente induziert wird.

Über die Funktion des PsbS sind bislang verschiedene Vermutungen aufgestellt worden, die hier näher diskutiert werden sollen.

(1) PsbS kann nur eine relativ geringe Anzahl von Pigmenten und diese auch nur schwach binden. Außerdem konnten keine Anzeichen für excitonische Wechselwirkungen gefunden werden. Ausgehend davon wurde eine Rolle des PsbS als transientes „chlorophyll storage protein“ vermutet (Funk, 2001). Neu synthetisiertes Chlorophyll könnte mit ebenfalls am PsbS gebundenen Carotinoiden assoziieren und diese würden gleichzeitig einen Schutz vor Photooxidation gewährleisten. Diese Vermutung würde einschließen, dass Carotinoide relativ stabil mit PsbS assoziiert sind und Chlorophylle eher lockerer und transient gebunden werden. Bei stabiler Carotinoidbindung würde man jedoch ein definiertes Carotinoid-Protein-Verhältnis erwarten, was in dieser Arbeit nicht beobachtet werden konnte (vgl. 4.2.2.). Für die Vermutung spricht das Ergebnis, dass PsbS mit Carotinoiden allein in einer distinkten Dichtegradientenbande isoliert werden kann, dass jedoch mit Chlorophyllen allein und ohne Carotinoide diese Bande sehr viel schwächer und diffuser ist.

(2) Eine weitere Annahme bezüglich der Funktion des PsbS ist, dass es im PS II-Schutzmechanismus NPQ eine Rolle spielt. Funk *et al.* konnten 1995 (b) zeigen, dass PsbS Carotinoide bindet, darunter Violaxanthin und Lutein, die eine Rolle in der nichtphotochemischen Fluoreszenzlöschung (NPQ) spielen (Niyogi *et al.*,

1997). Auch die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen eine Akkumulation von Carotinoiden. Da PsbS wie schon erwähnt auch in der Abwesenheit von Pigmenten stabil ist (Funk *et al.*, 1995b), könnte es auch schon während des Ergrünens der Pflanze eine Schutzfunktion ausüben (Li *et al.*, 2000). Einer *Arabidopsis thaliana*-Mutante, npq4, die eine Mutation im *psbS*-Gen aufweist, fehlt die Fähigkeit zum NPQ (Li *et al.*, 2000). Diese Mutante zeigt in der Pigmentzusammensetzung oder in der photosynthetischen Lichtsammlung keinen Unterschied zum Wildtyp. Ihr fehlen jedoch die energieabhängige Löschung und somit auch die durch Protonierung sowie durch Zeaxanthin-Bindung verursachte Konformationsänderung in der Thylakoidmembran, die bei einer PS II-Untereinheit die Ausbildung eines gequenchten Zustands auslöst (Gilmore, 1997). Es wurde vermutet, PsbS sei die Stelle der Protonierung und/oder Zeaxanthin-Bindung. Kürzlich wurde eine Zeaxanthin-Bindung am PsbS beschrieben und mit einer Absorptionsänderung in Verbindung gebracht, die mit der Ausbildung des qE auftritt (Aspinall O'Dea *et al.*, 2002). Da das PsbS für das NPQ essentiell ist, wurde vermutet, es sei eher an der Photoprotektion beteiligt, als am photosynthetischen Sammeln von Licht (Li *et al.*, 2000). Aus dieser Aussage leitet sich eine ähnliche Funktion ab, die mit Ergebnissen zur Protonierung dieses Proteins zu tun hat:

(3) Da PsbS auf der lumenalen Membranseite sechs saure Reste aufweist, könnte Protonierung Bestandteil einer möglichen Funktion des PsbS sein. Dominici *et al.*, (2002) konnten zeigen, dass das PsbS Protein eine Bindestelle für Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) aufweist. DCCD bindet unter hydrophoben Bedingungen an saure Reste des Proteins und blockiert durch seine Anwesenheit das energieabhängige Quenching qE des NPQ (Hoppe *et al.*, 1980). PsbS könnte als Sensor für niedrigen lumenalen pH fungieren, indem es Protonen bindet und so eine Übersetzung des niedrigen lumenalen pH-Wertes in die oben beschriebene Konformationsänderung von benachbarten *Cab*-Proteinen in einen „quenching state“ bewirkt, an denen dann das xanthophyllabhängige qE stattfindet (Dominici *et al.*, 2002; Li, *et al.*, 2000). Diese Funktion könnte PsbS auch unabhängig von der Pigmentbindung ausüben, da die Bindung von DCCD auch in Abwesenheit von Pigmenten nachgewiesen werden konnte (Dominici *et al.*, 2002). Vor diesem Hintergrund wäre es ebenfalls nicht auszuschließen, dass PsbS verschiedene Funktionen gleichzeitig übernehmen könnte: eine Rolle im NPQ durch Protonierung und Zeaxanthin-Bindung, Schutz vor photooxidativem Schaden durch Bindung anderer Carotinoide, außerdem eine Funktion als transients Chlorophyllcarrier in Gegenwart von Carotinoiden.

(4) PsbS akkumuliert neben den für das NPQ wichtigen Xanthophyllen auch β -Carotin. Dabei widerspricht der über unterschiedliche Versuche konstante Wert von genau einem β -Carotin pro Protein einer unspezifischen Anlagerung. Da dieses Carotinoid nicht am NPQ beteiligt ist, könnte seine Funktion in der Stabilisierung des PsbS liegen, indem es sich in der Nähe der Helices 1 und 3 anlagert. Es wären jedoch nähere Untersuchungen zur β -Carotin-Bindung am PsbS notwendig, um

genauere Informationen über seine Rolle in einem möglichen PsbS-Komplex zu erhalten.

(5) Ein weiterer Punkt in der Diskussion um die Funktion des PsbS könnte sein, dass PsbS in der Nähe des Photosystems II lokalisiert ist, genauer liegt PsbS in der LHC II- reichen Region, die den PS II-Superkomplex mit der Membran verbindet (Nield *et al.*, 2000). Als Bestandteil des flexiblen LHC II Pools könnte es daran beteiligt sein, LHC Proteine in der supermolekularen Organisation zu stabilisieren. Für diese Vermutung sprechen Beobachtungen an Pinien, in denen eine Zunahme der PsbS-Menge an eine verstärkte Reorganisation der Antennenproteine im Winter gekoppelt ist (Ottander *et al.*, 1995).

PsbS weist Sequenzähnlichkeiten zu sowohl den *Cab*-Antennenproteinen als auch zu der Familie der ELIPs auf, ähnelt den ELIPs jedoch eher in Bezug auf schwache Pigmentbindung sowie fehlende excitonische Kopplung. Für PsbS wie auch die ELIPs wurde eine Funktion als transiente Pigmentcarrier diskutiert (Funk, 2001). Da dem PsbS-Protein aber typische ELIP-Motive fehlen und es im Gegensatz zu den ELIPs eher in Grana-Thylakoiden zu finden ist, wird es zwar der erweiterten Familie der *Cab*-Proteine zugerechnet, übernimmt aber im Bezug auf seine mögliche Funktion jedoch eine gesonderte Stellung innerhalb dieser Familie.

4.3. ScpC/D – cyanobakterielle Cab-Proteine

Cyanobakterien weisen im Gegensatz zu höheren Pflanzen weder Chlorophyll b noch multihelicale *Cab*-Proteine auf. Umso erstaunlicher war es, als in Cyanobakterien *Cab*-ähnliche Proteine mit nur einer Transmembranhelix beschrieben wurden (Dolganov *et al.*, 1995; Funk & Vermaas, 1999). Diese in *Synechocystis* PCC 6803 als ScpA-E bezeichneten Proteine repräsentieren eine neue Gruppe von cyanobakteriellen Proteinen, von denen vermutet wird, dass sie transient Pigmente binden können (Funk & Vermaas, 1999). In dieser Arbeit wurde versucht, einerseits einen Einblick in die Pigmentbindung von nativem ScpC/D zu erhalten, andererseits sollten in Kooperation mit Christiane Funk, Umeå, über-exprimierte rekombinante Scp's *in vitro* mit Pigmenten rekonstituiert werden.

4.3.1. ScpC/D und ihre Pigmentbindung *in vivo* - und *in vitro*

ScpC/D sind in der Thylakoidmembran lokalisiert, befinden sich jedoch nicht in der Nähe der Photosysteme (Hao *et al.*, 2001). In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass ScpC/D mit Pigmenten aus cyanobakteriellen Thylakoiden isoliert sowie immunologisch nachgewiesen werden können. In der pigmentierten ScpC/D-

Bande wurden Echinenon, Chlorophyll a und β -Carotin detektiert. Wegen der großen Ähnlichkeit von ScpC und ScpD konnte im immunologischen Nachweis keines der beiden Proteine einzeln identifiziert werden. Da eine Trennung beider Proteine aufgrund des ähnlichen isoelektrischen Punktes und der nahezu gleichen Größe in den verwendeten Systemen nicht möglich war, wurden nur qualitative Pigmentanalysen durchgeführt. Weiterführende Experimente zur Aufreinigung oder Versuche an Mutanten, denen eines der beiden Proteine fehlt, würden eine genauere Aussage zu den Pigment-Protein-Stöchiometrien der einzelnen Proteine erlauben.

Nach zusätzlicher Aufreinigung der Bande über Saccharosedichtegradienten ergab sich keine weitere Abtrennung von freiem Pigment. Das kann einerseits bedeuten, dass die Bande nach der IEF schon kein freies Pigment mehr enthielt. Eine weitere Auftrennung macht demzufolge nur Aussagen über die Stabilität möglicher Komplexe, eine zufällige Komigration von ScpC/D und den Pigmenten wäre in diesem Fall unwahrscheinlich. Eine eventuelle Wechselwirkung von Pigmenten und Protein wäre jedoch relativ schwach ausgebildet, da eine Aufreinigung über ein schwach denaturierendes Deriphat-Gel anstelle des Gradienten keine pigmentierten Banden ergab. Aufgrund der milden Bedingungen muss daher auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass freies Pigment nicht vollständig abgetrennt werden kann.

Die Isolation von ScpC/D in Gegenwart von Pigmenten bekräftigte die Annahme, es handele sich hierbei um pigmentbindende Proteine. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Funk, Umeå, wurden erste Rekonstitutionsexperimente mit überexprimierten rekombinanten Scp's durchgeführt. Im Deriphat-Gel konnte kein Hinweis auf Pigmentbindung gefunden werden. CD-Spektren von nativen und rekonstituierten ScpC/D zeigten keinerlei Hinweis auf excitonische Wechselwirkungen. Wie schon für das PsbS-Protein diskutiert, muss aber excitonische Wechselwirkung kein notwendiges Merkmal für transiente Protein-Pigment-Komplexe sein. Geht man davon aus, dass ScpC/D in irgendeiner Form Pigmente binden können, ergeben sich für die Ergebnisse der Rekonstitutionsexperimente folgende Erklärungen:

(1) Die rekombinanten Proteine wiesen nach der Überexpression recht große Verunreinigungen durch bakterielles Protein auf, die sich evtl. störend auf die Rekonstitution ausgewirkt haben. Erneute Rekonstitutionsversuche sollen daher nach besserer Aufreinigung wiederholt werden. Eine Überexpression der Scp's unter der Kontrolle des starken *psbA* Promotors direkt in *Synechocystis* PCC 6803 ist in der AG Funk, Umeå, geplant. So soll die Isolation von Scp's in einem pigmentbindenden Stadium über einen Epitop-tag ermöglicht werden.

(2) Es wäre denkbar, dass eine transiente Pigmentbindung mit relativ schwacher Wechselwirkung zwischen Protein und Pigment erfolgt. Es darf jedoch die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass Scp's Pigmente nur unspezifisch

binden. In jedem Fall wären genauere Überprüfungen der Isolationsbedingungen für natives ScpC/D notwendig. Eine Optimierung der Rekonstitutionsbedingungen mit besser aufgereinigtem Protein sowie eine der nativen Isolation angenäherte, schonendere Aufreinigung der Rekonstitutionsprodukte über IEF könnte außerdem helfen, möglicherweise pigmentierte rekombinante Proteine aufzureinigen und zu charakterisieren.

Zur Pigmentbindung ist im LHC II eine Interaktion zwischen erster und dritter Transmembranhelix nötig (Kühlbrandt *et al.*, 1994). Diese wird durch die Interaktion zwischen einem positiv geladenen Arginin-Rest und einem negativ geladenen Glutaminsäurerest ausgebildet. Diese Reste sind hochkonservierte Bereiche innerhalb der *Cab*-Proteinfamilie und sind in allen fünf Scp's sowie *HliA* vorhanden (Dolganov *et al.*, 1995; Funk & Vermaas, 1999). Es wird angenommen, dass Scp's - analog zu der Interaktion der ersten und dritten Helix des LHC II - aus einer geraden Anzahl von Proteinen Homo- oder Heterooligomere bilden können (Funk & Vermaas, 1999). Die Carotinoide β -Carotin und Echinenon könnten als Brücke zwischen 2 Helices fungieren, analog zum Lutein im LHC II-Monomer. ScpC/D konnten in dieser Arbeit nach denaturierender SDS-PAGE in höhermolekularen Banden nachgewiesen werden, was eine generelle Aggregatbildung jedoch nicht ausschließt. Versuche, mögliche pigmentierte Oligomere der nativen und rekonstituierten Proteine über schwach denaturierende PAGE nachzuweisen, blieben bislang ohne Erfolg. Zur Untersuchung auf pigmentabhängige Bildung von Heterooligomeren könnten nach optimierter Proteinreinigung Rekonstitutionsexperimente mit anderen Scp's bzw. Vertretern der *Cab*-Familie nähere Informationen bringen.

4.3.2. Funktion von ScpC/D - transiente Pigmentcarrier in Stress-Situationen?

Nach IEF befanden sich in der nativen ScpC/D-Bande Chlorophyll a, Echinenon und β -Carotin. Die Carotinoide könnten (transient) gebundenen Chlorophyllen Schutz vor Photooxidation bieten. In den meisten höheren Pflanzen spielen Lutein und Zeaxanthin die größte Rolle in der Photoprotektion (Niyogi *et al.*, 1997), in *Synechocystis* wird diese Funktion hauptsächlich von Myxoxanthophyll übernommen (Steiger *et al.*, 1999), was unter Lichtstress das am stärksten akkumulierte Pigment darstellt. Aber auch Echinenon, das stabilste Carotinoid unter photooxidativen Bedingungen, und β -Carotin spielen eine wichtige Rolle (Steiger *et al.*, 1999). Im Cytochrom b_6f -Komplex höherer Pflanzen verhindert β -Carotin die Ausbildung von Singulett-Sauerstoff durch angeregtes Chlorophyll (Zhang *et al.*, 1999), in *Synechocystis* übernimmt Echinenon diese Funktion (Boronowsky *et al.*, 2001). Die Isolation von ScpC/D mit Echinenon, β -Carotin und Chlorophyll a spricht dafür, dass es nicht als Pigmentcarrier in der akuten Reaktion auf Stress fungiert, in der vermehrt Myxoxanthophyll akkumuliert wird, sondern vielmehr als ein tran-

sienter Pigmentcarrier, der auch stressunabhängig das stabile Pigment Echinonon bindet, um ebenfalls gebundene Chlorophyllmoleküle vor photooxidativem Stress zu schützen.

ScpC/D werden in Mutanten ohne Photosystem I, die einen 6-fach geringeren Chlorophyllgehalt aufweisen als der Wildtyp, stark exprimiert (Funk & Vermaas, 1999). Daher wird vermutet, dass die Akkumulation von ScpC/D an einen niedrigen Chlorophyll-Bedarf der Zelle geknüpft sein könnte. Die Proteine könnten als eine Art chlorophyllbindender Puffer funktionieren, indem sie überschüssiges, neu synthetisiertes Chlorophyll absorbieren (Funk & Vermaas, 1999). Um dieser Hypothese nachzugehen, wären Experimente interessant, in denen native Scp's mit unterschiedlichen Mengen an zusätzlichen Chlorophyllen zusammengebracht werden. Analog dazu könnten ähnliche Experimente mit rekombinanten Proteinen durchgeführt werden.

4.4. OHP, Sep1 und Sep2 – sind auch die „Vorfahren“ der LHC-Proteine in der Lage, Pigmente zu binden?

4.4.1. Pigmentbindung der kurzen Sequenzverwandten des LHC II

Für OHP und die Sep-Proteine konnte kein Hinweis auf pigmentabhängige Rekonstitution gefunden werden. Daraus lassen sich die Schlussfolgerungen ziehen, dass entweder die verwendeten Rekonstitutionsbedingungen oder Nachweismethoden nicht geeignet waren, oder, dass die kurzen Sequenzverwandten des LHC II stabil keine Pigmente binden. Die Rekonstitutionsversuche an den Scp's brachten ähnliche Ergebnisse. Beachtet man die vermutete Evolution der *Cab*-Proteine, könnte sich die Eigenschaft des Lichtsammelns erst nach Entstehung eines multi-Helix-*Cab*-Proteins entwickelt haben. Davor wurden Pigmente entweder gar nicht oder nur transient und so locker an das jeweilige Protein gebunden, dass eine Bindung mit biochemischen Methoden schwer nachweisbar wird. Solch eine transiente Pigmentbindung konnte auch für die Scp's nicht nachgewiesen werden. Nach Montané & Kloppstech (2000) war das Sammeln von Licht nicht die ursprüngliche Funktion der *Cab*-Proteine, sondern vielmehr der Schutz des Photosystems vor photooxidativem Stress. Dazu müssten jedoch Wechselwirkungen mit Carotinoiden nachweisbar sein. Im Falle von Sep2 konnte gezeigt werden, dass es auf einer Nickel-Sepharose-Säule Carotinoide zurückhielt, von einer dauerhaften Bindung kann in dem Fall jedoch nicht gesprochen werden (vgl. Staatsexamensarbeit K. Schumacher, 2001).

Das Homologie-Modelling für OHP ergab zwei theoretische Pigmentbindestellen im helicalen Bereich des Proteins und außerdem eine zusätzliche potentielle Bindestelle in der Nähe des N-Terminus. Da dieser im Kühlbrandt-Modell des LHC II nicht näher aufgelöst ist, kann die Bindestelle in der Strukturvorhersage jedoch nicht verwendet werden. Wie auch schon für die Sep's diskutiert, könnte es beim OHP ähnlich zur Interaktion der ersten und dritten Helix des LHC II auch eine Wechselwirkung zwischen zwei Proteinmolekülen geben, die dann zur Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren führen könnte (vgl. 4.3.1; Jansson *et al.*, 2000). Tatsächlich gibt es in der Transmembranhelix des OHP das Arginin 33 und das Glutamat 28, die dafür in Frage kämen. Da bei Rekonstitutionsversuchen des OHP jedoch weder Dimerisierung noch Carotinoidbindung beobachtet werden konnte, muss davon ausgegangen werden, dass diese entweder nicht stattfindet oder dass sich Heterodimere bilden. Rekonstitutionsversuche mit OHP und den 2-Helix-Sep's im gleichen Ansatz zeigten keine Pigmentbindung. Es wäre denkbar, dass es sich bei einem potentiellen Dimerisierungspartner ebenfalls um ein 1-Helix-Protein oder aber um einen bislang unbekanntes Kofaktor handeln könnte. OHP hätte dann nicht die Eigenschaft des LHC II zur spontanen Selbstorganisation. Versuche zur Identifizierung eines solchen Kofaktors müssten allerdings *in vivo* stattfinden.

Eine Funktion als transienter Pigmentcarrier kann für OHP mit den in dieser Arbeit gezeigten Daten nicht bestätigt werden, darf aber aufgrund der konservierten Pigmentbindestellen auch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Da Sep1 und Sep2 zur Verringerung der Aggregatbildung sowohl von Carotinoiden als auch von Chlorophyllen beitragen, und immobilisiertes Sep2 Carotinoide zurückhielt, wären diese Proteine eher Kandidaten für transiente Pigmentcarrier. Um sich dieser Vermutung anzunähern, wären jedoch weitere Rekonstitutionsexperimente notwendig.

4.4.2. OHP - Import und Insertion

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche zum Import von pOHP in isolierte Erbsenchloroplasten zeigten keinen Erfolg. Gleiches galt für den Import in isolierte *Arabidopsis*-Chloroplasten sowie für die Insertion in die Thylakoidmembran. Der als Kontrolle verwendete Import von pLHCP in Erbsenchloroplasten konnte dagegen erstmals immunologisch nachgewiesen werden (vgl. Diplomarbeit S. Grundler, 2002). Er war zuvor der Sensitivität wegen radioaktiv detektiert worden (Kosemund, 1999). Es stellte sich heraus, dass der α -His₅-Antikörper für die nachzuweisenden LHC II- Mengen als ausreichend empfindlich eingestuft werden kann. Maturiertes OHP konnte mit diesem System jedoch nicht nachgewiesen werden. Dafür sind mehrere Erklärungen denkbar:

Nach Import- und Insertionsexperimenten wurde matures OHP sowohl nach Proteasebehandlung der Chloroplasten/ Thylakoide als auch in der unbehandelten

Kontrolle detektiert. Es scheint also in aggregierter Form vorzuliegen, was zur Folge hatte, dass es entweder nicht importiert werden konnte, oder aber dass so geringe Mengen importiert wurden, dass sie trotz der geringen Nachweisgrenze immunologisch doch nicht mehr detektierbar waren. Da OHP ein hydrophobes Protein ist, wären aber auch Aggregationen mit der Membran denkbar.

Eine weitere Erklärung wäre, dass ein zum Import essentieller Kofaktor im Erbsensystem fehlt. OHP war nach Translation in einem Weizenkeimsystem in Gegenwart von ^{35}S -Methionin erfolgreich in isolierte Erbsenchloroplasten importiert worden (Jansson *et al.*, 2000). Eventuell weist der Weizenkeimextrakt für den Import nötige Faktoren auf, die in der Form im Erbsenblattextrakt nicht gegeben waren. Variationen des Systems und Versuche zum Import in isolierte *Arabidopsis*-Chloroplasten zeigten jedoch ebenfalls keinen Erfolg.

Es wäre weiter denkbar, dass sich durch die Denaturierung des rekombinanten Proteins in Harnstoff mit anschließender Dialyse gegen Blattextrakt Unterschiede in der Sekundär-/Tertiärstruktur des Signalpeptides ergeben haben, die im Weizenkeimsystem nicht auftraten.

4.5. Proteine der Cab-Familie: Hypothesen über Funktion im Bezug auf ihre Entwicklung

Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine OHP, Scp, Sep und PsbS zeigen Ähnlichkeit zu allen Evolutionsstufen der *Cab*-Proteine (vgl. 1.4.2.). Für alle kurzen Sequenzverwandten ELIPs und HLIPs werden Funktionen in der Antwort auf Lichtstress vermutet (Montané & Klopstech, 2000; Adamska, 1997). Für die hier betrachteten Proteine wurde eine Rolle als transiente Pigmentcarrier in Betracht gezogen. Mit den Untersuchungen zur pigmentabhängigen Faltung der ein- und zwei-Helix-Proteine konnte diese Vermutung nicht bestätigt werden. In Anbetracht der Schwierigkeiten des Nachweises von transienten Wechselwirkungen kann jedoch auch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass diese Proteine dennoch Pigmente binden können und dass folglich die hier verwendeten Rekonstitutions- und Nachweismethoden ungeeignet waren.

Das PsbS-Protein kommt eher für die Rolle des transienten Pigmentcarriers in Betracht. Sowohl das native PsbS (Funk *et al.*, 1995a) als auch das in dieser Arbeit untersuchte rekombinante Protein wurde mit Pigmenten isoliert, was aber unter stringenteren Bedingungen nicht mehr gewährleistet war (Dominici *et al.*, 2002; vgl. auch 3.2.1.). Außerdem waren keine excitonischen Interaktionen zwischen den gebundenen Pigmenten feststellbar. Aus diesem Zusammenhang folgt die Annahme, dass sich eine stabile und spezialisierte Interaktion des Proteins mit Pigmenten erst mit der Deletion der vierten Transmembranhelix entwickelt hat. Dies unterstützt die schon zuvor aufgestellte Theorie, das Sammeln von Licht sei nicht die ursprüngliche Funktion der *Cab*-Proteine (Montané & Klopstech, 2000).

Wenn nach Montané & Klopstech (2000) das Sammeln von Licht nicht die primäre Funktion der *Cab*-Proteine war, stellt sich weiter die Frage, welcher Faktor für die Pigmentbindung ausschlaggebend ist. Proteine, die den evolutiven Vorläufern des LHC II gleichen, binden Pigmente nicht nachweisbar oder nur transient. Das könnte evtl. an der Struktur liegen. Die sich überkreuzenden Helices spielen eine wichtige strukturelle Rolle bei der Pigmentbindung des LHC II (Kühlbrandt *et al.*, 1994). Diese strukturelle Voraussetzung ist beim PsbS zumindest theoretisch auch gegeben. Kürzere Proteine müssten oligomerisieren, um eine solche Struktur zu erfüllen. Eine Oligomerisierung konnte für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proteine mit den verwendeten Methoden nicht nachgewiesen werden. Versuche mit veränderten Rekonstitutions- und Aufreinigungsbedingungen könnten zur Aufklärung dieses Punktes beitragen.

5. Zusammenfassung

Chlorophyll a/b-bindende Proteine gehören zu den häufigsten Proteinen der Erde. Sie bilden eine Proteinfamilie, zu der neben den Antennenproteinen der Photosysteme auch die „early light-induced proteins“ (ELIPs) gehören. Die Mitglieder dieser Familie weisen zumeist drei Transmembranhelices auf, es gibt aber auch kürzere Proteine mit zwei (Sep1 & 2) oder nur einem Membrandurchgangsbereich (OHP und die cyanobakteriellen Scp's) sowie das PsbS-Protein mit vier Helices. Die erwähnten Proteine zeigen Sequenzähnlichkeiten zum Hauptlichtsammelkomplex des Photosystems II (LHC II) und obwohl es keine Antennenproteine sind, werden ihnen pigmentbindende Eigenschaften zugeschrieben.

In dieser Arbeit wurden Experimente zur Pigmentbindung von rekombinantem, bakteriell exprimiertem OHP, Scp, Sep1, Sep2 und PsbS durchgeführt. Anhand der Ergebnisse zur Pigmentbindung sollten Rückschlüsse auf ihre Funktion gezogen werden. PsbS konnte nach Rekonstitution mittels Dichtegradienten-Ultrazentrifugation als pigmentierte Bande isoliert werden, deren Pigment-Stöchiometrien eine deutliche Akkumulation von Carotinoiden zeigten. Mit CD-Spektroskopie konnte pigmentabhängig eine stärkere Helixbildung detektiert werden. PsbS-Rekonstitutionsprodukte wurden in Kristallisationsexperimente eingesetzt und es konnten 2D-Kristalle beobachtet werden (C. Büchel, pers. Kommentar). Trotz erforderlicher Optimierung der Kristallisationsbedingungen ist dieses Ergebnis der stärkste Hinweis auf Pigmentbindung an das PsbS-Protein, da dieses in Abwesenheit von Pigmenten keine Kristalle ausbildete. Eine excitonische Kopplung der Pigmente an das PsbS konnte nicht festgestellt werden und die Rekonstitutionsprodukte waren auf einem schwach denaturierenden Gel nicht stabil. Die Ergebnisse unterstützen die Vermutung, PsbS sei ein transient pigmentbindendes Protein.

Für OHP sowie Sep1 und Sep2 konnte keine stabile Pigmentbindung nachgewiesen werden. Sep2 hielt bei der Rekonstitution nach Immobilisierung auf einer festen Oberfläche Carotinoide zurück, es ergab sich jedoch kein Hinweis auf eine Spezifität der Pigmentbindung. Die kurzen Sequenzverwandten können also entweder keine Pigmente binden, oder die Bindung ist transient und so schwach, dass sie mit den verwendeten Methoden nicht nachgewiesen werden kann.

WSCP aus Blumenkohl ist ein wasserlösliches Protein, das Chlorophylle zu binden vermag. Seine Funktion ist bislang unklar. Rekonstitutionsversuche wurden bisher erfolgreich an einem Fusionsprotein mit dem Maltosebindenden Protein durchgeführt. In dieser Arbeit wurde ein WSCP-Konstrukt mit N-terminal angehängtem His-Tag hergestellt und in Bakterien überexprimiert. WSCP-his bildet pigmentabhängig Tetramere und bindet Chlorophylle, nicht aber Carotinoide. In seinen biochemischen und spektroskopischen Eigenschaften zeigt das rekombinante Protein keinen Unterschied zum nativen WSCP und kann daher als geeignetes Werkzeug für Untersuchungen zur Funktion dieses Proteins herangezogen werden.

Rekonstitutionsexperimente mit verschiedenen Chlorophyll-Derivaten zeigten, dass der Phytolrest für die Oligomerisierung des Proteins verantwortlich ist. WSCP bindet neben Chlorophyllen auch die Vorstufen Chlorophyllid und Mg-Protoporphyrin IX. Es könnte sich daher um ein Carrierprotein handeln, welches die Chlorophyll-Vorstufen von der Chloroplasten-Hüllmembran durch das Stroma zur Thylakoidmembran transportiert. WSCP bindet keine Carotinoide. Der Fall eines chlorophyllbindenden Pflanzenproteins ohne zusätzlich gebundene Carotinoide ist jedoch bislang einmalig. Messungen zur Photostabilität und zum Nachweis von Singulett-Sauerstoff zeigten aber, dass es dennoch das gebundene Chlorophyll vor photooxidativer Schädigung schützt.

6. Literatur

Adamska, I., 1997. ELIPs – light-induced stress proteins. *Physiol. Plant.* 100:794-805.

Adamska, I., 2001. The ELIP family of stress proteins in the thylakoid membrane of pro- and eukaryota. In: Aro, E.-M., Andersson, B. (Eds), *Regulation of Photosynthesis*, Vol 8. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp pp. 487-505.

Aspinall-O'Dea, M., Wentworth, M., Pascal, A., Robert, B., Ruban, A., Horton, P., 2002. *In vitro* reconstitution of the activated zeaxanthin state with energy dissipation in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:16331-16335.

Bassi, R., Sandoná, D., Croce, R., 1997. Novel aspects of chlorophyll a/b binding proteins. *Physiol. Plant.* 100(4):769-779.

Booth, P., Paulsen, H., 1996. Assembly of light-harvesting chlorophyll a/b complex *in vitro*. Time-resolved fluorescence measurements. *Biochemistry* 35 (16): 5103-5108

Booth, P. J., Riley, M. L., Flitsch, S. L., Templer, R. H., Farooq, A., Curran, A. R., Chadborn, N., Wright, P., 1997. Evidence that bilayer bending rigidity affects membrane protein folding. *Biochemistry* 36: 197-203.

Booth, P., 2000. Unravelling the folding of bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta* 1460:4-14

Boronowsky, U., Wenk, S.-O., Schneider, D., Jäger, C., Rögner, M., 2001. Isolation of membrane protein subunits in their native state: evidence for selective binding of chlorophyll and carotenoid to the b₆ subunit of the cytochrome b₆f complex. *Biochim. Biophys. Acta* 1506:55-66.

Brettel, K. and Sétif, P., 1987. Magnetic field effects on primary reactions in photosystem-I. *Biochim. Biophys. Acta* 893, 109-114.

Briantais, J.-M., Vernotte, C., Picaud, M., Krause, G. H., 1979. A quantitative study of the slow decline of chlorophyll a fluorescence in isolated chlorophylls. *Biochim. Biophys. Acta* 548:128-138.

Caliebe, A., Soll, J., 1999. News in chloroplast protein import. *Plant Mol. Biol.* 39: 641-645

Cline, K., Ettinger, W. F., Theg, S. M., 1992. Protein-specific energy requirements for protein transport across or into thylakoid membranes. *J. Biol. Chem.* 264:14225-14232.

Croce, R., Remelli, R., Varotto, C., Breton, J., Bassi, R., 1999. The neoxanthin binding site of the major light-harvesting complex (LHC II) from higher plants. *FEBS Lett.* 456:1-6.

Dilly-Hartwig, H., Allen, J. F., Paulsen, H., Race, H. L., 1998. Truncated recombinant light harvesting complex II proteins are substrates for a protein kinase associated with photosystem II core complexes. *FEBS Lett.* 435:101-104.

Dolganov, N. A. M., Bhaya, D., Grossman, A. R., 1995. Cyanobacterial protein with similarity to the chlorophyll a/b binding proteins of higher plants: Evolution and regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 92:636-640.

Dominici, P., Caffarri, S., Armenante, F., Ceoldo, S., Crimi, M., Bassi, R., 2002. Biochemical properties of the PsbS subunit of photosystem II either purified from chloroplast or recombinant. *J. Biol. Chem.* 277(25) 22750-22758.

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.

Eisen, Christoph, 1991. Rekonstitution von LHCP/Pigment-Komplexen mit Chlorophyll-Analogen. *Diplomarbeit an der biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians Universität München.*

6. Literatur

- Funk, C., Schröder, W. P., Green, B. R., Renger, G., Andersson, B.,** 1994. The intrinsic 22 kD protein is a chlorophyll-binding subunit of photosystem II. *FEBS Lett.* 342:261-266.
- Funk, C., Schröder, W. P., Napiwotzki, A., Tjus, S. E., Renger, G., Andersson, B.,** 1995a. The PSII-S protein of higher plants: a new type of pigment-binding protein. *Biochemistry* 34(35):11133-11141.
- Funk, C., Adamska, I., Green, B. R., Andersson, B., Renger, G.,** 1995b. The nuclear-encoded chlorophyll-binding photosystem II-S protein is stable in the absence of pigments. *J. Biol. Chem.* 270:30141-30147.
- Funk, C., Vermaas, W.,** 1999. A cyanobacterial gene family coding for single-helix proteins resembling part of the light-harvesting proteins from higher plants. *Biochemistry* 38:9307-9404.
- Funk, C.,** 2001. The PsbS protein: A Cab-protein with a function of its own. In: Aro, E.-M., Andersson, B., (Eds.) *Regulation of Photosynthesis* 453-467. Kluwer Academic Publishers.
- Galla, H.-J.,** 1988. Spektroskopische Methoden in der Biochemie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart.*
- Gavel, Y., Steppuhn, J., Herrmann, R., von Heijne, G.,** 1991. The „positive-inside rule“ applies to thylakoid membrane proteins. *FEBS Lett.* 282:41-46.
- Gilmore,** 1997. Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol. Plant.* 99:197-209.
- Green, B. R., Pichersky, E., Kloppstech, K.,** 1991. Chlorophyll a/binding proteins: an extended family. *Trend. Biol. Sci.* 16:181-186.
- Green, B. R., Pichersky, E.,** 1994. Hypothesis for the evolution of three-helix Chl a/b and Chl a/c light-harvesting antenna proteins from two-helix and four-helix ancestors. *Photos. Res.* 39:149-162.
- Grundler, S.,** 2002. Versuche zum Import von „One-Helix-Protein“ (OHP) in isolierte Erbsen-Chloroplasten. *Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg Universität Mainz.*
- Hao, L., Schmidt, K., Paulsen, H., Funk, C.,** 2001. Functional studies on the small Cab-like proteins of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proceeding S31-005, 12th International Congress on Photosynthesis, Brisbane, Australia. CSIRO Publishing.*
- Hartwich, G., Fiedor, L., Simonin, I., Cmiel, E., Schäfer, W., Noy, D., Scherz, A., Scheer, H.** 1998. Metal-substituted bacteriochlorophylls. 1. Preparation and influence of metal and coordination on spectra. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 3675-3683.
- He, Q., Dolganov, N., Björkman, O., Grossman, A.,** 2001. The high-light inducible polypeptides in *Synechocystis* PCC 6803, expression and function in high light. *J. Biol. Chem.* 276 (1): 306-314
- 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.* 97 (7): 3741-3746
- Heineman, B.,** 1999. Random mutations directed against trans-membrane an loop domains of light-harvesting chlorophyll a/b protein: Impact on complex formation and pigment binding. *Dissertation am Fachbereich Biologie, Universität Mainz.*
- Heldt, H.-W.,** 1999. Pflanzenbiochemie. 2. Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.*
- Helfrich, M., and Rüdiger, W.,** 1992. Various metallophorbides as substrates for chlorophyll synthetase. *Z. Naturforsch. Sect. C. Biosci.* 47, 231-238.
- Hiller, R. G., Anderson, J. M., Larkum, A. W. D.,** 1991. The chlorophyll-protein complexes of algae. In Scheer, H., (Ed.) *Chlorophylls. CRC Press, Boca Raton*, pp. 529-547.

6. Literatur

- Hobe, S.**, 1995. Trimerisierung des *in vitro*-rekonstituierten Lichtsammelkomplexes höherer Pflanzen und spektroskopische Untersuchungen zur Pigmentorganisation. *Dissertation an der Fakultät für Biologie der Ludwigs-Maximilian Universität München*.
- Hobe S, Fey H, Rogl H, Paulsen H.**, 2003. Determination of relative chlorophyll binding affinities in the major light-harvesting chlorophyll a/b complex. *J. Biol. Chem.* 278(8):5912-9.
- Hörtensteiner, S.**, 1999. Chlorophyll breakdown in higher plants and algae. Review, *Cell. Mol. Life Sci.* 56:330-347.
- Holzwarth, A. R.**, 1999. Die primären Prozesse der Photosynthese. In: Häder, D.-P. (Hrsg.), *Photosynthese*. Thieme Verlag Stuttgart.
- Hoppe, J., Schairer, H. U., Sebald, W.**, 1980. Identification of amino-acid substitutions in the proteolipid subunit of the ATP synthase. *Eur. J. Biochem.* 112:17-24.
- 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.
- Horton, P., Ruban, A. V., Walters, R. G.**, 1996. Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:655-684.
- Ilami, G., Nespoulos, C., Huet, J.-C., Vartanian, N., Pernellet, J.-C.**, 1997. Characterization of BnD22, a drought-induced protein expressed in *Brassica napus* leaves. *Phytochem.* 45:1-8.
- Jansson, S.**, 1994. The light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins. Review. *Biochim. Biophys. Acta* 1184:1-19.
- Jansson, S., Andersson, J., Kim, J.S., Jackowski, G.**, 2000. An *Arabidopsis thaliana* protein homologous to cyanobacterial high-light-inducible proteins. *Plant Mol. Biol.* 42: 345-351
- 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 (2): 133-138.
- Kim, S.J., Jansson, S., Hoffman, N.E., Robinson, C., Mant, A.**, 1999. Distinct „assisted“ and „spontaneous“ mechanisms for the insertion of polytopic chlorophyll-binding proteins into the thylakoid membrane. *J. Biol. Chem.* 274 (8): 4751-4721.
- Kosemund, K.**, 1999. Die Biogenese von Chlorophyll-a/b-bindenden Lichtsammelkomplexen: Topographie des Apoproteins bei der Thylakoidinsertion. *Dissertation am Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg Universität Mainz*.
- Kühlbrandt, W., Wang, D.N. and Fujiyoshi, Y.** 1994 Atomic model of plant light-harvesting complex. *Nature* 367:614-621.
- Kuttkat, A. N.**, 1997. Untersuchungen zur Insertion und Assemblierung des Chlorophyll a/B-bindenden Lichtsammelproteins an isolierten Thylakoidmembranen höherer Pflanzen. *Dissertation an der Fakultät für Biologie der Ludwigs-Maximilian Universität München*.
- Laemmli, U. K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Li, X., Henry, R., Yuan, J., Cline, K., Hoffman, N. E.**, 1995. A chloroplast homologue of the signal recognition particle subunit SRP54 is involved in the posttranslational integration of a protein into thylakoid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3789-3793.
- Li, X.-P., Björkman, O., Shih, C., Grossman, A.R., Rosenquist, M., Jansson, S., Niyogi, K.K.**, 2000. A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light-harvesting. *Nature* 403: 391-395.

6. Literatur

- Lopez, F., Vansuyt, G., Fourcroy, P., Casse-Delbart, F.,** 1994. Accumulation of a 22-kD protein and its mRNA in the leaves of *Raphanus sativus* in response to salt stress or water deficit. *Physiol. Plant.* 91:605-614.
- Markwell, J. P., Thornber, P., Boggs, R. T.,** 1979. Higher plant chloroplasts: Evidence that all the chlorophyll exists as chlorophyll-protein complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 76: 1233-1235.
- Martinson, T.A., Plumley, F.G.,** 1995. One-step extraction and concentration of pigments and acyl lipids by sec.-butanol from in vitro and in vivo samples. *Anal. Biochem.* 228:123-130.
- Matile, P., Schellenberg, M., Vicentini, F.,** 1997. Localization of chlorophyllase in the chloroplast envelope. *Planta* 201, 96-99.
- Montané, M.H., Dreyer, S., Triantaphylidès, C., Kloppstech, K.,** 1997. Early light-inducible proteins during long-term acclimation of barley to photooxidative stress caused by light and cold: high level of accumulation by posttranscriptional regulation. *Planta* 202, 293–302.
- Montané, M.-H., Kloppstech, K.,** 2000. The family of light-harvesting-related proteins (LHCs, ELIPs, HLIPs): Was the harvesting of light their primary function? 258: 1-8
- Müller, P., Li, X. P., Niyogi, K. K.,** 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Phys.* 125: 1558-1566.
- Murata, T., Toda, F., Uchiono, K., Yakushiji, E.,** 1971. Water-soluble chlorophyll protein of *Brassica oleracea* var. *botrys* (cauliflower). *Biochim. Biophys. Acta* 245:208-215.
- Murata, T., Ishikawa, C.,** 1981. Chemical, physicochemical and spectrophotometric properties of crystalline chlorophyll-protein complexes from *Lepidium virginicum* L. *Biochim. et Biophys. Acta* 635: 341-347.
- Nield, J., Funk, C., Barber, J.,** 2000. Supermolecular structure of photosystem II and location of the PsbS protein. *Phil. Trans.R. Soc. Lond. B* 355: 1337-1344.
- 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
- Niyogi, K. K., Björkman, O., Grossman, A. R.,** 1997. The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:14162-14167.
- Niyogi, K. K.,** 1999. Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 50, 333-359.
- Norling B., Zak E., Andersson B., Pakrasi H.,** 1998. 2D-isolation of pure plasma and thylakoid membranes from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Letters* 436:189-192.
- Oku, T., Yoshida, M., and Tomita, G.,** 1972 Heat stability of the phototransforming activity of *Chenopodium* chlorophyll protein. *Plant Cell Physiol.* 13, 183-186.
- Ottander, C., Campbell, D., Öquist, G.,** 1995. Seasonal changes in photosystem II organisation and pigment composition in *Pinus sylvestris*. *Planta* 197:176-183.
- 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
- Paulsen, H., Hobe, S., and Eisen, C.,** 1991. Reconstitution of LHCP-pigment complexes with mutant LHCP and chlorophyll analogs. In: *Regulation of Chloroplast Biogenesis* (Argyroudi-Akoyunoglou, J. H., Ed.) pp 343-348, Plenum Publishers, New York.
- Paulsen, H., Finkenzeller, B., Kühlein, N.,** 1993. Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein. *Eur. J. Biochem.* 215 (3): 809-816.

6. Literatur

- Paulsen, H.**, 1995. Chlorophyll a/b-binding proteins. *Photochem. Photobiol.* 62:367-382.
- Pierre, Y., Breyton, C., Lemoine, Y., Robert, B., Vernotte, C., and Popot, J. L.**, 1997. On the presence and role of a molecule of chlorophyll a in the cytochrome b₆f complex *J. Biol. Chem.* 272, 21901-21908.
- Plumley, G., Schmidt, G.**, 1987. Reconstitution of chlorophyll a/b light-harvesting complexes: Xanthophyll-dependent assembly and energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:146-150.
- Porra, R.J., Thompson, W.A., Kriedemann, P.E.**, 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. et Biophys. Acta* 975: 384-394.
- Raunser, S.**, 2000. Überexpression und Rekonstitution von OHP („one helix protein“) aus *Arabidopsis thaliana*. & Trimerisierung des rekombinanten Lichtsammelkomplexes II bei Variation des Xanthophyllangebotes. *Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg Universität Mainz*.
- Reinbothe, S., Reinbothe, C.**, 1996. Regulation of chlorophyll biosynthesis in angiosperms. *Plant Physiol.* 111: 1-7.
- 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.**, 1996. Biochemie der Pflanzen. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*.
- Rogl, H., Kosemund, K., Kühlbrandt, W., Collinson, I.**, 1998. Refolding of *Escherichia coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography. *FEBS Letters* 432:21-26.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.**, 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *PNAS* 74: 5436-5467.
- 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(9): 906-911.
- Schmidt, W.**, 2000. Optische Spektroskopie. 2. Auflage, *Wiley-VCH, Weinheim*
- Schoch, S., Brown, J.**, 1987. The action of chlorophyllase on chlorophyll-protein complexes. *J. Plant Physiol.* 126: 483-497.
- Schumacher, K.**, 2001. Versuche zur Pigmentierung von kleinen Verwandten der Chlorophyll a und b bindenden Proteine *in vitro*. *Staatsexamensarbeit am Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg Universität Mainz*.
- Somerville, C. R., Somerville, S. C., Ogren, W. L.**, 1980. Isolation of photosynthetically active protoplasts and chloroplasts from *Arabidopsis thaliana*. *Plant sci. Lett.* 21: 89-96.
- Sugiyama, K.I., Murata, N.**, 1978. Analysis of Absorption and Fluorescence Spectra of Water-Soluble Chlorophyll Proteins, Pigment System II Particles and Chlorophyll a in Diethylether Solution by the Curve-Fitting Method. *Biochim. Biophys. Acta* 503:107-119.
- Steiger, S., Schäfer, L., Sandmann, G.**, 1999. High-light-dependent upregulation of carotenoids and their antioxidative properties in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 52:14-18.

6. Literatur

Strasburger, Noll, Schenck, Schimper, 1923. Lehrbuch der Botanik für Hochschulen, 16. Aufl.,s. 237. Fitting, Jost, Schenck, Karsten (Eds.), *Gustav Fischer-Verlag*, Jena.

Stryer, L., 1990. Biochemie, *Verlag Spektrum der Wissenschaft*.

Svec, W. A., 1991. The distribution and extraction of the chlorophylls. In: *Chlorophylls* (Scheer, H., Ed.) pp 89-102, CRC Press, Boca Raton.

Tanaka, A., Itoh, H., Tanaka, N. K., Yoshida, K., Okada, K., 1998. Chlorophyll a oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll b formation from chlorophyll a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:12719-12723.

von Heijne, G., 1983. Patterns of Amino Acids near Signal-Sequence Cleavage Sites. *Eur.J.Biochem.* 133:17-21.

von Wettstein, D., Gough, S., Kannangara, C. G., 1995. Chlorophyll biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1039-1057.

Wilhelm, C., 1999. Photosynthese der Algen. In: Häder, D.-P. (Hrsg.), *Photosynthese*. Thieme Verlag Stuttgart.

Woolhead, C., Bolhuis, A., Robinson, C., 2000. Novel mechanism for the targeting of proteins into and across chloroplast membranes. *Biochem. Soc. Trans.* 28 (4): 491-494.

Yakushiji, E., Uchino, K., Sugimura, Y., Shiratori, I., Takamiya, F., 1963. Isolation of water-soluble chlorophyll protein from the leaves of *Chenopodium album*. *Biochim. et Biophys. Acta* 75: 293-298.

Yang, C., Horn, R., Paulsen, H., 2003. Light-harvesting chlorophyll a/b-complex (LHC IIb) can be reconstituted in vitro from its completely unfolded apoprotein. *Biochemistry*, in press.

Zak, E., Norling, B., Andersson, B., Pakrasi, H., 1999. Subcellular localization of the BtpA protein in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *European Journal of Biochemistry* 261:311-316.

Zhang, H., Huang, D., Cramer, W. A., 1999. Stoichiometrically bound β -carotene in the cytochrome b_6/f complex of oxygenic photosynthesis protects against oxygen damage. *J. Biol. Chem.* 274:1581-1587.

7. Anhang

7.1. Abkürzungen

Abs	Absorption	Lil	light-harvesting like
Amp	Ampicillin	LM	Dodecylmaltosid
AMS	Ammoniumsulfat	Lu	Lutein
APS	Ammoniumpersulfat	MBP	Maltose-Binding Protein
AS	Aminosäure	2-ME / β-ME	2-oder β -Mercaptoethanol
ATP	Adenosintriophosphat	Mg-Proto IX	Mg-Protoporphyrin IX
BCA	Bicinchoninic Acid	Mw	Molekulargewicht
BCIP	5% [w/v] 5-Bromo4-chloro-3-indolyphosphat	NaP	Natriumphosphat
BSA	Rinderserumalbumin	NBT	5% Nitroblautetrazoliumchlorid
Cab	Chlorophyll a/b-bindend	Nx	Neoxanthin
Car	Carotinoide	OD	Optische Dichte
CD	Circular Dichroismus	OHP	one helix protein
Chl	Chlorophyll	OG	Octyl- β -D-glucopyranosid
DMF	Dimethylformamid	p.A.	per analysi, zur Analyse
DNA	Desoxyribonucleinsäure	PAA	Polyacrylamid
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ddNTP	Didesoxyribonucleosidtriphosphat	pl	Isoelektrischer Punkt
DS	Dodecylsulfat	PNK	Polynukleotidkinase
DTT	Dithiothreitol	RBS	Ribosomenbindestelle
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	RP	Reversed Phase
ELIP	Early Light-Induced Protein	rpm	Umdrehungen pro Minute
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat	Sep	stress-enhanced protein
GuHCl	Guanidinium Hydrochlorid	Scp	small <i>Cab</i> -like protein
His	Histidin	SDS	Natriumdodecylsulfat
HLIP	high light-induced protein	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
HPLC	high-performance liquid chromatography	TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
IB	Inclusion Body	TCA	Trichloressigsäure
IEF	Isoelektrische Fokussierung	UV	Ultraviolett
IPTG	Isopropyl- β D-thiogalactopyranosid	VIS	sichtbarer Bereich des Lichts
kD	Kilodalton	Vx	Violaxanthin
LDS	Lithiumdodecylsulfat	WSCP	water-soluble chlorophyll protein
LHCP	light-harvesting complex protein		

7.2. Sequenzen & Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Proteine

LHC II (D7f.3)

(Dilly-Hartwig *et al.*, 1998)

MRKSATTKKV ASSGSPWYGP DRVKYLGPFSS GESPSYLTGE FPGDYGWDTA
 GLSADPETFS KNRELEVIHS RWAMLGALGC VFPELLSRNG VKFGEAVWFK
 AGSQIFSEGG LDYLGNPSTLV HAQSILAIWA TOVILMGAVE GYRIAGGPLG
 EVVDPLYPPG SFDPLGLADD PEAFaelkVK ELKNGRLAMF SMFGFFVQAI
 VTGKGPLENL ADHLADPVNN NAWSYATNFV PGK

Transmembrandomänen

Mw: 25045,5 g/mol (25kD)
Anzahl Aminosäuren: 233
Nettoladung: -6
Extinktionskoeffizient: 47718 (M*cm)⁻¹
A280=1 (1cm) 0.52 mg/ml; 0.21 mM
pI: 4,93 (EMBL)

C2.4h 35b.1

Prä-LHCP, wie D7f.3, mit Cystein in stromaler Schleife
 wie D7f.3, Schleifenregion zwischen 2. und 3. Transmembranhelix deletiert,
 rekonstituiert nicht.

OHP (SR-7)

(Jansson *et al.*, 2000; Raunser, 2000)

MSSSPLSSSL FHPLSTLSTH CHGRRQNLFC NRKQOPFVVR AAKLPEGVIV
 PKAQPKSQPA FLGFTQTAEI WNSRACMIGL IGTFIVELTL NKGILELIGV
 EIGKGLDLPL

Transmembrandomäne

Stefan Jansso

Thorsten Schweickhardt

Mw: 12010,2 g/mol (11kD)
Anzahl Aminosäuren: 110
Nettoladung: +5
Extinktionskoeffizient: 6982 (M*cm)⁻¹
A280=1 (1cm) 1.72 mg/ml; 0.143 mM
pI: 9,98 (EMBL)

SR7-his2 wie SR-7, His-Tag am N-Terminus
 (Raunser, 2000)

ScpC

(Funk & Vermaas, 1999)

MTTRGFRLDQ DNRLNNFAIE PEVYVDSSVQ AGWTKYAEKM NGRFAMIGFA
 SLLIMEVVTG HGVIWLNLSL

mögliche Transmembrandomäne!

nach dem „DAS“-Transmembrane Prediction Server (vgl. 6.4)

Mw: 7868,0 g/mol (kD)
Anzahl Aminosäuren: 70
Nettoladung: -1
Extinktionskoeffizient: 14828 (M*cm)⁻¹
pI: 5,54 (EMBL)

ScpD

(Funk & Vermaas, 1999)

MTSRGFRLDQ DNRLNNFAIE PPVYVDSSVQ AGWTEYAEKM NGRFAMIGFV
 SLLAMEVITG HGIVGWLNSL

mögliche Transmembrandomäne!

nach dem „DAS“-Transmembrane Prediction Server (vgl. 6.4)

Mw: 7822,9 g/mol (kD)
Anzahl Aminosäuren: 70
Nettoladung: -2
Extinktionskoeffizient: 14828 (M*cm)⁻¹
pI: 4,86 (EMBL)

Sep 1 (N-terminal Thioredoxin)

(Heddad & Adamska, 2000)

MALSQVSASL AFSLPNSGAL KLATITNPTS TCRVHVPQLA GIRSTFASGS
 PLLPLKLSMT RRGGNRAASV SIRSEQSTEG SSGLDIWLGR GAMVGFVAVAI
 TVEISTGKGL LENFGVASPL PTVALAVTAL VGVLAADFIF QSSSKN

Transmembrandomänen

— myristoylation sites

Mw: 14858,3 g/mol (kD)

Anzahl Aminosäuren: 146
Nettoladung: + 6
Extinktionskoeffizient: 6782 (M*cm)⁻¹
pI: 11,33 (EMBL)

Sep2

(Heddad & Adamska, 2000)

MAMATRAIRY QLPSRFRAP RCESEPIKQ IQIQORPRGG DLAENGKIVL
 QPRLCTLSY GSDMVIKGD GGDGGGGSD VELASPFET LTDYIESSKK
 SQDFETISGR LAMIVFAVTV TEEIVTGNISL FKKLDVEGLS EAIGAGLAAM
GCAAMFAWLT ISRNRVGRIF TVSCNSFIDS LVDQIVDGLF YDTKPSDWS
 DL

Transmembrandomänen

— myristoylation sites

Mw: 21989,2 g/mol (kD)
Anzahl Aminosäuren: 202
Nettoladung: -4
Extinktionskoeffizient: 19250 (M*cm)⁻¹
pI: 4,79 (EMBL)

PsbS

(Wedel *et al.*, 1992; Funk, 2001; Umklonierung mit C-terminalem His-Tag von C. Büchel, Frankfurt)

Transitsequenz

MAQAMLLMMP GVSTTNTIDL KRNALLKLQI QKIKPKSSTS NLFFSPLPSS
 SSSSSTVFKT LALFKSKAKA PKKVEKPKLK VEDGLFGTSG GIGFTKENEL
 FVGRVAMIGF AASLLGEGIT GK GILSQLNL ETGIPIYEA E PLLLLFILFT
 LLGAIGALGD RGRFVDEPTT GLEKAVIPPG KDVRSA LGLK TKGPLFGFTK
 SNELFVGRLA QLGFAFSLIG EIITGKGALA QLNIE TGVPI NEIEPLVLLN
 VVFFFIAAIN PGTGKEITDD EED

Transmembrandomänen

Mw: 29197,4 g/mol (22kD)
Anzahl Aminosäuren: 274

Nettoladung:	+3	
Extinktionskoeffizient:	5557 (M*cm) ⁻¹	
A280=1 (1cm)	5.25 mg/ml	0.18mM
pI:	9,55 (EMBL)	

MBP-WSCP(Satoh *et al.*, 1998)

Das Fusionsprotein besteht aus WSCP und dem N-terminal angehängten MBP. Letzteres wird auch MalE genannt und ist ein Teil des Maltose/Maltodextrin-Systems von *E. coli*, das an der Aufnahme und dem Abbau von Maltodextrin beteiligt ist. Das MBP hat ca. 41 kD und besteht aus 2 Domänen, zwischen die die Maltose gebunden wird.

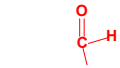
WSCP-his

MRHHHHHHEF REQVKDSNGN PVKRGAKYFI QPAKSNGGGL VPAAINILPF
 CPLGITQTLL PYQPGLPVSF GYEPVIVGTD YIYTSTTINI EFRSEIWPVC
 NELSKLWAVD VSSSAAKEPA IIIGGERTAP NSKFKIEEAT GAHTYKLTTS
 SGTVGTIPGP WLGAPQLIAT NDDAKTLFVK FVKVDDDATK ATTSTSRVEK
 LGLRMFPFY

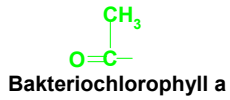
Hydrophober Bereich

Mw:	22872,3 g/mol (22kD)
Anzahl Aminosäuren:	209
Nettoladung:	+2
Extinktionskoeffizient:	28910 (M*cm) ⁻¹
A280=1 (1cm)	0.79 mg/ml; 0.035 mM
pI:	8,4 (ExPASy) – 8,7 (EMBL)

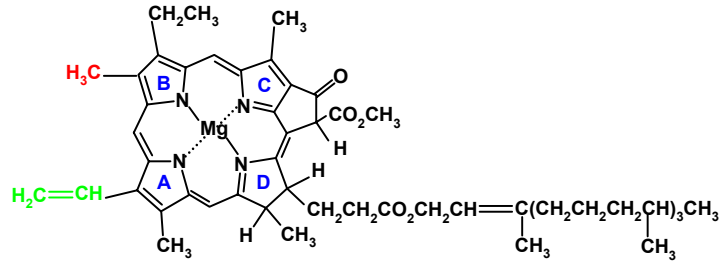
7.3. Strukturen der Pigmente und Pigment-Derivate



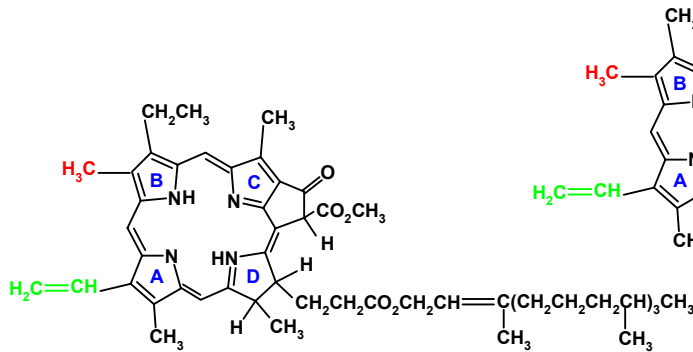
Chlorophyll b



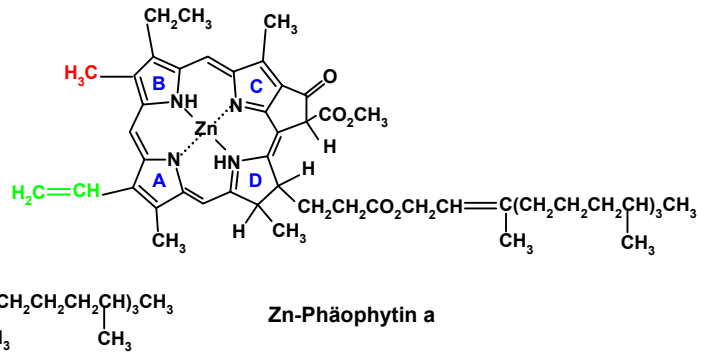
Bakteriochlorophyll a



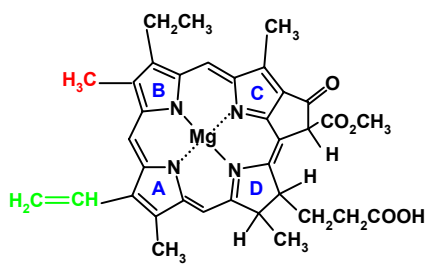
Chlorophyll a



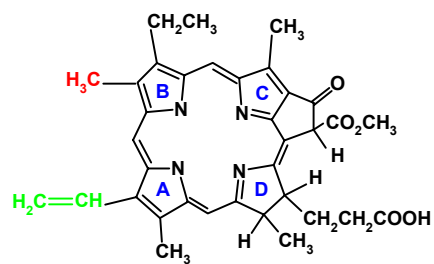
Phäophytin a



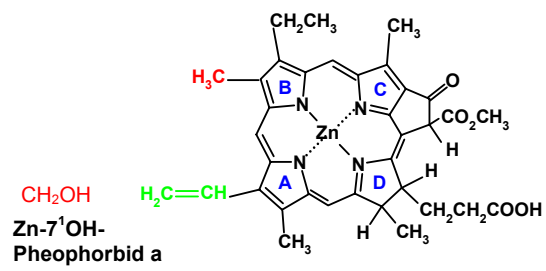
Zn-Phäophytin a



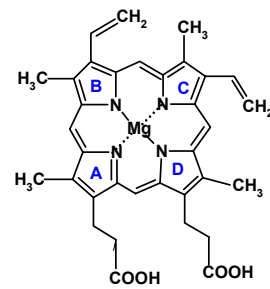
Chlorophyllid a



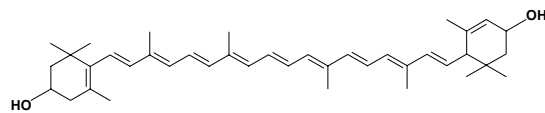
Phäophorbid a



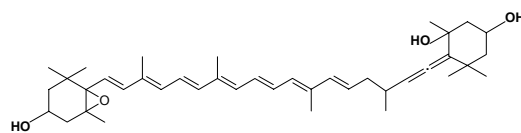
Zn-Phäophorbid a
(Zn-Chlorophyllid)



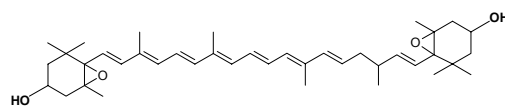
Mg-Protochlorophyllin IX



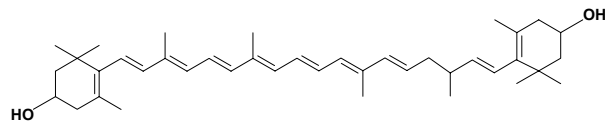
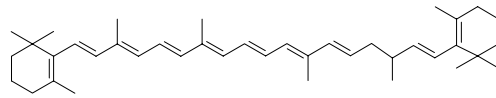
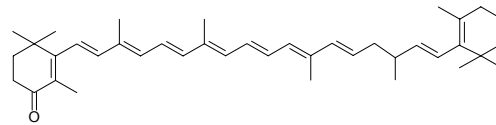
Lutein



Neoxanthin



Violaxanthin

**Zeaxanthin****β- Carotin****Echinenon**

7.4. Internetseiten zur Bestimmung von Proteineigenschaften.

„Schepartz Biopolymer Calculator“ <http://paris.chem.yale.edu/extinct.html>
Hier kann man über die Aminosäuresequenz den Extinktionskoeffizienten ermitteln lassen.

ExpASy Molecular Biology Server <http://www.expasy.org>

SWISS PROT and TrEMBL <http://www.expasy.org/sprot>
„protein knowledge database“

Berechnung des Isoelektrischen Punktes <http://www.embl.de/cgi/pi-wrapper.pl>

Sekundärstruktur-Abschätzung <http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein>

„DAS“-Transmembrane Prediction Server <http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS>
Diese Seite ist nützlich, wenn man sich für Abschätzungen über eventuelle Transmembranbereiche interessiert.

Protein Colourer <http://www.ebi.ac.uk/proteincol/index.html>

Alignment- Paarweise <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>