

Stabilisierung des pflanzlichen

Lichtsammlers LHCIIb:

Beitrag der luminalen Schleifendomäne und
Entwicklung eines evolutiven Verfahrens zur
Stabilitätsverbesserung des rekombinanten

Pigment-Protein-Komplexes

Dissertation zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vera Mick

geb. am 3.5.1976 in Bad Dürkheim

Mainz, 2004

Dekan: Prof. Dr. H. Paulsen

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	LHCIIb	1
1.1.1	Aufbau der Photosystem II-Antenne	1
1.1.2	Nomenklatur der Lhc-Proteine	2
1.1.3	Energietransfer	2
1.1.4	Schutz vor photooxidativer Schädigung	3
1.1.5	Kristallstruktur	4
1.1.6	Pigmentbindung	5
1.1.7	Konservierte Aminosäuren	6
1.1.8	Stabilität	7
1.1.9	Stabilisierende Funktion der stromalen Schleifendomäne	7
1.1.10	Regulative Funktion der luminalen Schleifendomäne	8
1.2	In vitro-Evolution zur Steigerung der Stabilität des LHCIIb	8
1.2.1	Phage-Display	9
1.2.2	T7Select 10-3b	10
1.3	Problemstellung	11
2	Material und Methoden	13
2.1	Chemikalien und Geräte	13
2.2	Klone	16
2.3	Primer und Oligonukleotide	18
2.4	Plasmid-DNA-Arbeiten	20
2.4.1	Plasmid-Vektor und bakterieller Wirtstamm	20
2.4.2	Agarosegelelektrophorese	20
2.4.2.1	Größenvergleich/Quantifizierung	20
2.4.2.2	Gelelution	21
2.4.3	PCR	21
2.4.4	Restriktionen	21
2.4.5	Dephosphorylierung	21
2.4.6	DNA-Fällungen	22
2.4.6.1	Phenol/Chloroformextraktion und Isopropanolfällung	22

2.4.6.2	Ethanol-Fällung	22
2.4.7	Ligation	22
2.4.8	Transformation	23
2.4.8.1	Herstellung kompetenter Zellen	23
2.4.8.2	Transformation kompetenter Zellen	23
2.4.9	Kolonie-Lift	24
2.4.10	Plasmid-Präparation	25
2.4.10.1	Minipräparation (nach He et al., 1990)	25
2.4.10.2	Midi-Präparation	25
2.4.11	Photometrische DNA-Quantifizierung	26
2.4.12	DNA-Sequenzierung	26
2.4.13	Oligonukleotid-Annealing	26
2.4.14	Phosphorylierung	27
2.4.15	Mutagenese-PCR	27
2.4.16	Herstellung des Lhcb1-Derivates W97Rhis	28
2.4.17	Herstellung der Lhcb1-Mutanten I143H, N183D und E207G	28
2.5	Expression von Lhcb1-Proteinen als Phage-Display	28
2.5.1	Geeignete Restriktionsschnittstellen	29
2.5.2	Konstrukte	29
2.5.2.1	T7 1n.1	29
2.5.2.2	T7 1n.1h	30
2.5.2.3	T7 D7f.3	31
2.5.2.4	T7 GlySer	32
2.5.2.5	T7 GlySerSphI	33
2.5.2.6	T7 Lhcb1-Mutantenbibliothek	33
2.5.2.7	T7 ZepLink	33
2.5.3	Allgemeine Lösungen und Medien	36
2.5.4	Amplifizierung der Bakteriophagen in Flüssigkultur	36
2.5.4.1	Volumina bis 200 ml	36
2.5.4.2	Volumina ab 200 ml	37
2.5.5	Dauerkulturen	38
2.5.6	Reinigung und Konzentrierung der Bakteriophagen	38
2.5.6.1	Chloroform-Extraktion	38
2.5.6.2	Filtration	38
2.5.6.3	Zentrifugation durch einen Glyzerin-Stufengradienten	38
2.5.7	Herstellung der T7 DNA-Vektor-Arme	39
2.5.7.1	Präparation der T7 Vektor-DNA	39
2.5.7.2	Verdau mit Restriktionsenzymen	40
2.5.8	Ligation	40
2.5.9	In vitro-Packaging	40
2.5.10	Plaque-Assay zur Bestimmung des Phagentiters	41

2.5.11	Plaque-Lift	42
2.5.12	PCR mit Plaque-Material	42
2.5.13	Sequenzierung	43
2.6	Standard-Expression von Lhcb1-Proteinen	43
2.6.1	400 ml Kulturvolumen	43
2.6.2	5 ml Kulturvolumen	44
2.6.3	Expression in Mikrotiterplatten	45
2.7	Rekonstitution von Pigment-Protein-Komplexen	45
2.7.1	Pigmente	45
2.7.2	SDS-Verdünnung	46
2.7.3	Detergenswechsel	46
2.7.4	Frier-Tau-Zyklen	47
2.7.5	Guanidiniumhydrochlorid-Rekonstitution und Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation	48
2.8	Proteinbiochemische Methoden	49
2.8.1	Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	49
2.8.2	Acetonfällung von Proteinen	49
2.8.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	50
2.8.3.1	Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	50
2.8.3.1.1	Gelsystem nach Lämmlí (1970)	50
2.8.3.1.2	Gelsystem nach Schägger und von Jagow (1987)	51
2.8.3.2	Schwach denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese	52
2.8.3.3	Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliant Blau	53
2.8.3.4	Quantifizierung der Proteinbanden	53
2.8.4	Western Blot	53
2.8.4.1	Nachweis von Lhcb1-Proteinen oder His6-Tags mithilfe von Antikörpern	54
2.8.4.2	Biotin-Nachweis mithilfe von NeutrAvidin-AP	56
2.8.5	Protease-Verdau	56
2.8.5.1	Carboxypeptidasen	57
2.8.5.1.1	Carboxypeptidase A	57
2.8.5.1.2	Carboxypeptidase Y	57
2.8.5.1.3	Carboxypeptidase P	58
2.8.5.2	Trypsin	58
2.8.6	SH-Gruppen-Markierung	58
2.8.6.1	Selektive Blockierung zugänglicher SH-Gruppen in einer Mischung von Apoproteinen und Pigment-Protein-Komplexen	58
2.8.6.2	Reinigung der Bakteriophagen nach einer Blockierungsreaktion	59
2.8.6.3	Vollständige Markierung von SH-Gruppen	60

2.9	Immobilisierung von Bakteriophagen	61
2.9.1	Immobilisierung von Biotin-markierten Bakteriophagen in NeutrAvidin-beschichteten Mikrotiterplatten	61
2.9.2	Immunopräzipitation mit Lhcb1-Antikörpern	61
2.9.3	Affinitätsreinigung von Lhcb1-Antikörpern	62
2.9.3.1	Herstellung der Affinitätssäule	62
2.9.3.2	Reinigung der Lhcb1-Antikörper	63
2.9.4	Immobilisierung von Bakteriophagen auf Lhcb1-Antikörper-beschichteten Mikrotiterplatten	64
2.10	Fluoreszenzspektroskopie	65
2.10.1	Aufnahme von Fluoreszenzspektren	66
2.10.1.1	„Front-Face“-Messung unverdünnter Rekonstitutionsansätze	66
2.10.1.2	90°-Winkel-Messung verdünnter Rekonstitutionsansätze	66
2.10.2	Fluoreszenzkinetik bei 37°C	67
2.11	FACS – Fluorescence Activated Cell Sorting	67
3	Ergebnisse	69

3.1	Möglichkeiten zur Selektion stabiler LHCIIB-Mutanten	69
3.1.1	Expression des Lhcb1 als Phage Display	69
3.1.2	Spezifische Sortierung stabiler LHCIIB-Mutanten	70
3.1.2.1	Carboxypeptidase-Verdau	70
3.1.2.1.1	Carboxypeptidase A	72
3.1.2.1.2	Carboxypeptidase P und Y	73
3.1.2.2	Cysteinmarkierung mit Biotinmaleimid	73
3.1.2.2.1	Blockierbarkeit der SH-Gruppe in Komplex und Apoprotein – Abhängigkeit von der Aminosäureposition	74
3.1.2.2.2	Vergleich verschiedener Blockierungsreagenzien	75
3.1.2.2.3	Blockierung mit Jodacetamid	76
3.1.2.2.4	Versuche zur Anwendbarkeit der SH-Gruppen-Markierung im Phage-Display-System	77
3.1.2.2.4.1	Der Lyse-Zeitpunkt als Maß für die Anzahl immobilisierter Bakteriophagen	78
3.1.2.2.4.2	Spezifische Immobilisierung Biotin-markierter Bakteriophagen	80
3.1.2.2.4.3	Blockierbarkeit von T7 WT	81
3.1.2.3	FACS – Fluorescence- activated cell sorting	82
3.1.2.4	Trypsinverdau	84
3.1.2.4.1	Nachweis des Fusionsproteins nach Rekonstitution und Trypsinverdau	86
3.1.2.4.2	Nachweis einer spezifischen Immobilisierung der Lhcb1-Phagen durch Anreicherungsexperimente	87
3.1.2.4.2.1	Vergleich verschiedener Elutionsbedingungen	88
3.1.2.4.2.2	Vergleich der Anreicherung auf passiv beschichteten Anti-Lhcb1- und auf Protein G-Platten mit Anti-Lhcb1-Antikörpern	89

3.1.2.4.2.3	Anreicherung von Lhcb1-Phagen unter Selektionsbedingungen	90
3.1.2.4.3	Nachweis der möglichen Anreicherung rekonstituierter Lhcb1-Mutanten	91
3.2	Selektionen	93
3.2.1	Herstellung der Mutantenbibliotheken	94
3.2.2	Durchführung der Selektionen	96
3.2.2.1	Selektionsexperiment 1	97
3.2.2.2	Selektionsexperiment 2	100
3.2.2.3	Selektionsexperiment 3	102
3.2.3	Stabilität der Mutanten E207G und N183D	104
3.2.3.1	Anteil der grünen Pigment-Protein-Komplexbande nach einer schwach denaturierenden Gelelektrophorese	104
3.2.3.1.1	Auswahl geeigneter Bedingungen für die schwach denaturierende Gelelektrophorese	105
3.2.3.1.2	Relative Komplexbandenintensitäten von E207G und N183D	106
3.2.3.2	Fluoreszenzkinetik	108
3.2.3.2.1	Zeitabhängige Änderung des Energietransfers bei 37°C	108
3.2.3.2.2	Zeitabhängige Änderung des Energietransfers in Gegenwart von 4 M Guanidiniumhydrochlorid	111
3.2.3.3	Trypsinverdau	113
3.3	Optimierungsmöglichkeiten	115
3.3.1	Mutationsrate	115
3.3.1.1	Bestimmung der bisherigen Mutationsrate	115
3.3.1.2	Bestimmung der Mutationsrate nach Verwendung eines anderen PCR-Puffers	116
3.3.2	Verkürzte Fusionsproteine	119
3.4	Aminosäureaustausche in der luminalen Schleife	121
3.4.1	Herstellung der Mutanten	121
3.4.2	Screening der Mutanten-Bibliothek	122
3.4.3	Vergleichende Stabilitätsuntersuchungen	124
3.4.3.1	Schwach denaturierende Gelelektrophorese	124
3.4.3.2	Dissoziationskinetiken der LHCIIB-Mutanten bei 37°C	127
3.4.3.3	Zugänglichkeit der luminalen Schleifendomäne für tryptische Spaltungen	128
4	Diskussion	133
4.1	Mutationsanalyse der luminalen Schleife	133
4.1.1	Destabilisierende Einzelaminosäureaustausche	133
4.1.1.1	Lokalisation destabilisierender Einzelaminosäureaustausche	133
4.1.1.2	Einschränkungen der Mutationsanalyse	134
4.1.1.3	Destabilisierung durch Änderung der chemischen Eigenschaften einer Aminosäureposition	134
4.1.2	Vergleichende Stabilitätsuntersuchungen	137

4.1.2.1	Destabilisierung durch SDS/LDS	138
4.1.2.2	Thermodynamische Destabilisierung	139
4.1.2.3	Destabilisierende Effekte einzelner Aminosäuren	140
4.1.3	Zusammenfassung	142
4.2	Selektion stabiler LHCIIB-Mutanten durch die proteolytische Degradation entfalteter Proteine	143
4.2.1	Anreicherung von Lhcb1-Proteinen mit Wildtyp-Stabilität	143
4.2.1.1	Gehäuftes Auftreten der Lhcb1-Wildtyp-Sequenz	143
4.2.1.2	Gehäuftes Auftreten der Mutanten E207G und N183D	145
4.2.1.2.1	Anreicherung einzelner Mutanten	145
4.2.1.2.2	Mögliche Selektionsvorteile der Mutanten E207G und N183D	146
4.2.2	Methodische Einschränkungen	149
4.2.2.1	Anreicherungsfaktoren	149
4.2.2.2	Selektionsbedingungen	150
4.2.3	Wahrscheinlichkeit stabilisierender Mutationen	152
5	Zusammenfassung und Ausblick	154

Anhang		156
---------------	--	------------

Sequenzen		156
Literaturverzeichnis		174
Abkürzungen		181

1. Einleitung

Höhere Pflanzen nutzen zur Absorption der Lichtenergie Antennenstrukturen aus Chlorophyll-bindenden Lichtsammelproteinen, die wie die Komplexe der photosynthetischen Elektronentransportkette in die Thylakoidmembran eingebettet sind. Die Lichtenergie wird in diesen Strukturen absorbiert und effizient zu den Reaktionszentren der Photosynthese geleitet, wo sie schließlich die Abspaltung eines Elektrons bewirkt, das in die Elektronentransportkette eingespeist wird. Das Prinzip der Photosynthese gleicht damit der Funktion einer Solarzelle, in der die Lichtenergie ebenfalls eine Ladungstrennung bewirkt. Die technische Nutzung der pflanzlichen Lichtsammelstrukturen in der Photovoltaik könnte nicht nur die Effizienz der Solarzellen steigern, ihre Herstellung wäre auch vergleichsweise kostengünstig. Im Gegensatz zu synthetischen Farbstoffen assemblieren sich diese Lichtsammelproteine nach Mischen ihrer Bestandteile im Reagenzglas von selbst.

In der Pflanze gleicht die Verwendung dieser hoch-effizienten Lichtsammelstrukturen einem Spiel mit dem Feuer. Bei starker Sonneneinstrahlung wirken sie wie Brennläser, eine Adaptivität des Systems bzgl. der Lichtverhältnisse ist unbedingt erforderlich. Diese Adaptivität wird durch ein kompliziertes Regulationssystem, sowohl auf der Ebene der Synthese als auch durch eine Modulation der Effizienz der bestehenden Strukturen gewährleistet. Eine Adaptivität dieser Art wäre für eine technische Anwendung nicht erforderlich, stattdessen wäre eine gesteigerte Stabilität der Pigment-Protein-Komplexe wünschenswert. Da nicht auszuschließen ist, dass die Adaptivität des Lichtsammelsystems während der Evolution auf Kosten der Stabilität der Pigment-Protein-Komplexe erreicht wurde, erscheint eine Stabilitätssteigerung durch Mutationen des Polypeptidrückgrates denkbar.

Die Verbesserung der Stabilität eines Proteins durch Mutationen kann prinzipiell auf zwei Wegen erreicht werden. Bekannte Strukturdaten können herangezogen werden, um potentiell stabilisierende Aminosäureaustausche zu identifizieren, deren Effekt anschließend zu verifizieren ist. Dieser Ansatz erfordert allerdings detaillierte Kenntnis der Architektur des Untersuchungsobjektes. Falls die erforderlichen Kenntnisse nicht vorliegen, bietet es sich an, dem Beispiel der Evolution zu folgen, und nach Einfügen zufälliger Mutationen stabilisierte Mutanten zu selektieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein System zur Selektion stabiler Mutanten eines Lichtsammelproteins entwickelt und getestet. Daneben wurde der Effekt destabilisierender Aminosäureaustausche eingehend untersucht, um die Bedeutung einer bestimmten Domäne in Bezug auf die Stabilität des Pigment-Protein-Komplexes zu verstehen.

1.1 LHCI**II**

Das Untersuchungsobjekt der vorliegenden Arbeit war der LHCI**II**, der Hauptlichtsammelerkomplex des Photosystems II in höheren Pflanzen. Dieser Pigment-Protein-Komplex liegt *in vivo* eingebettet in die Thylakoidmembran vor. In Gegenwart von Detergenzien lässt sich der LHCI**II** *in vitro* aus seinen Bestandteilen, dem Protein und den Pigmenten, rekonstituieren (Paulsen et al., 1990), und unterscheidet sich damit von einem Großteil der Membranproteine. Zunächst soll die Funktion des LHCI**II** *in vivo*, seine Tertiärstruktur, sowie bisherige Erkenntnisse über die Stabilität dieses Pigment-Protein-Komplexes näher beleuchtet werden.

1.1.1 Aufbau der Photosystem II-Antenne

Die Antenne des Photosystem II (PSII) besteht aus verschiedenen Pigment-bindenden Proteinkomplexen, die sich zunächst in die Chlorophyll (Chl) *a*-bindenden

Kernantennenkomplexe CP43 und CP47, sowie die Chl *a/b*-bindenden Lhc-Proteine unterteilen lassen. Die Kernantennen sind den Photosystemen unmittelbar benachbart, während die Lhc-Proteine die äußere Antenne des PSII bilden. Dabei unterscheidet man die minoren Komplexe LHCIId (CP24), LHCIIf (CP26) und LHCIIfa (CP29), die als Monomere vorliegen, und den majoren LHCIIfb (LHCII), der in Trimeren organisiert ist. Neben diesen Antennenkomplexen wurde ein weiteres Protein der Lhc-Proteinfamilie in Assoziation mit dem PSII entdeckt (PsbS) (Funk et al., 1994), das an Mechanismen zum Schutz des Photosystems vor oxidativer Schädigung beteiligt zu sein scheint (vgl. Kap. 1.1.5).

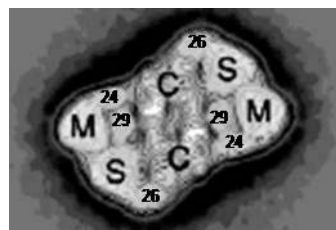


Abb. 1.1: Anordnung der peripheren Antennen-Komplexe in PSII-Superkomplexen.

Abbildung entnommen aus Yakushevskaya et al., 2003 (verändert). C: PSII-Core. M/S: M- und S-Typ der LHCIIb-Trimere. 29: LHCIIa; 26: LHCIIc; 24: LHCIIId

Die Anzahl der LHCIIb-Trimere pro PSII-Superkomplex schwankt, nach ihrer Bindungsstärke unterscheidet man drei Bindungspositionen: Trimere in Position S sind fest gebunden, Position M zeichnet sich durch mäßige Bindungsstärke aus und in Position L, die in Abb. 1.1 nicht zu sehen ist, binden LHCIIb-Trimere nur lose an den PSII-Superkomplex (Boekema et al., 1999).

1.1.2 Nomenklatur der Lhc-Proteine

Im Folgenden soll die Nomenklatur nach Thornber et al., 1994 zur Benennung der Pigment-Protein-Komplexe verwendet werden, während die Apoproteine nach Jansson et al., 1992 benannt werden. In Tab. 1.1 ist außerdem die ebenfalls gebräuchliche Nomenklatur nach Bassi et al., 1990 verzeichnet.

Chl <i>a/b</i> -Komplexe		Apoproteine	Photosystem
Bassi et al., 1990	Thornber et al., 1994	Jansson et al., 1992	
LHCI-680	LHCIa	Lhca2, Lhca3	PSI
LHCI-730	LHCIb	Lhca1, Lhca4	
LHCII	LHCIIb	Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3	PSII
CP29	LHCIIa	Lhcb4	
CP26	LHCIIc	Lhcb5	
CP24	LHCIIId	Lhcb6	
CP22	-	psbS-Produkt	

Tab. 1.1: Übersicht über die Nomenklatur der Chl *a/b*-Komplexe und der zugehörigen Apoproteine. Nach Paulsen et al., 1995.

In vivo sind die Proteine Lhcb1-3 in LHCIIb-Trimeren zu finden. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit LHCIIb-Monomeren gearbeitet, die durch Rekonstitution des Lhcb1-Proteins mit Pigmenten aus Erbsenpflanzen hergestellt wurden.

1.1.3 Energietransfer

Die Hauptfunktion der Antennenkomplexe ist die Absorption von Lichtenergie, die zum Reaktionszentrum der Photosynthese weitergeleitet wird. Die Absorption erfolgt mithilfe der Chlorophylle *a* und *b*, die jeweils ein Absorptionsmaximum im blauen (410 bzw. 460 nm) und eines im roten Spektralbereich (680 bzw. 660 nm) zeigen. Die dazwischen liegende

„Grünlücke“ wird zum Teil durch die Absorption der Carotenoide geschlossen, die ebenfalls einen festen Bestandteil der Chl *a/b*-bindenden Lhc-Proteine bilden. Die Weiterleitung der Anregungsenergie erfolgt durch strahlungslosen Energietransfer, die Pigment-Moleküle sind so eng benachbart, dass Anregungszustände zwischen einzelnen Molekülen übertragen werden (Excitonen-Transfer). Chl *a* zeigt das langwelligste Absorptionsmaximum, die Energie kann daher nur von Chl *b* auf Chl *a* übertragen werden.

Die Anregungsenergie breitet sich von den Chl *a*-Molekülen der Lhc-Proteine über die Chl *a*-bindenden Kernantennen-Komplexe bis zum Reaktionszentrum der Photosynthese aus, wo diese Energie die Abgabe eines Elektrons durch ein spezielles Chlorophyll *a*-Dimer bewirkt. Diese Ladungstrennung, die wesentlich langsamer erfolgt als der strahlungslose Energietransfer, leitet die Umsetzung der Anregungsenergie in elektrochemische Energie ein, die zunächst in Form eines Protonen-Ungleichgewichts zwischen Thylakoid-Innerem (Lumen) und dem umgebenden Chloroplasten-Stroma, gespeichert wird. Über eine Elektronentransportkette wird das Elektron von seinem hohen Energiezustand auf ein niedrigeres Energieniveau überführt. Die Energiedifferenz wird genutzt, um Protonen aus dem Stroma in das Thylakoid-Lumen zu pumpen. Entsprechend ist bei Belichtung der Chloroplasten eine Ansäuerung des Lumens zu beobachten.

1.1.4 Schutz vor photooxidativer Schädigung

Falls die Anregungsenergie die Kapazität der Elektronentransportkette übersteigt, muss überschüssige Anregungsenergie entsorgt werden, um Beschädigungen des Photosyntheseapparates zu vermeiden. Speziell in diesem Zusammenhang kommt den Carotenoiden der Lhc-Proteine besondere Bedeutung zu.

Ein Chl *a* im Singulett-Anregungszustand ($^1\text{Chl}^*$) kann auf verschiedenen Wegen in den Grundzustand zurückkehren. Die Energie kann z.B. als Fluoreszenz abgestrahlt werden. *In vivo* beobachtet man jedoch nur geringe Chl *a*-Fluoreszenz, offensichtlich werden daher andere Wege der Energie-Dissipation beschritten. Unter gemäßigter Belichtung wird die Chl *a*-Fluoreszenz durch Weiterleitung der Energie an die Reaktionszentren unterdrückt (gequencht). Bei starker Belichtung, wenn die Anregungsenergie nicht mehr vollständig photochemisch genutzt werden kann, kommen alternative Möglichkeiten der Fluoreszenz-Löschung zum Einsatz (Non-photochemical quenching NPQ), deren Mechanismen bislang nur in Teilen aufgeklärt wurden. Ein Großteil der Prozesse, die am NPQ beteiligt sind, zeigt eine Abhängigkeit von dem elektrochemischen Gradienten zwischen Thylakoid-Lumen und Stroma und wird als qE bezeichnet (Müller et al., 2001).

Prinzipiell kann $^1\text{Chl}^*$ durch Abgabe von Wärme in den Grundzustand zurückkehren. Ausgehend von einem Singulett-Anregungszustand kann allerdings auch der Triplett-Zustand ($^3\text{Chl}^*$) erreicht werden, wobei $^3\text{Chl}^*$ seine Energie an Sauerstoff übertragen und diesen in einen Singulett-Anregungszustand ($^1\text{O}_2^*$) versetzen kann. $^1\text{O}_2^*$ ist extrem reaktiv und richtet große Schäden im Photosystem an, seine Entstehung muss daher vermieden werden. Die Carotenoid-Moleküle der Lhc-Proteine können die Anregungsenergie des $^3\text{Chl}^*$ übernehmen und so der Entstehung des $^1\text{O}_2^*$ vorbeugen.

In Zusammenhang mit einem ΔpH -abhängigen NPQ wurde in höheren Pflanzen das Auftreten eines bestimmten Xanthophylls, des Zeaxanthins, beobachtet (Demmig-Adams, 1990), das an verschiedene Lhc-Proteine bindet (Thayer et al., 1992; Bassi et al., 1993; Lee et al., 1995; Ruban et al., 1994). Dieses Xanthophyll entsteht durch die zweifache Deepoxidierung des Violaxanthins, die durch das Enzym Violaxanthin-Deepoxidase (VDE) katalysiert wird. Der niedrige pH führt dabei zur Aktivierung des Enzyms. Daneben muss der niedrige pH-Wert jedoch noch weitere Auswirkungen haben. Mutanten von *Chlamydomonas* und *Arabidopsis*, die konstitutiv Zeaxanthin produzieren, zeigen nach wie vor eine pH-Abhängigkeit des qE

(Niyogi, 1999). Nach Beobachtungen, dass ein ΔpH ausreichend ist, um die Lebenszeit des $^1\text{Chl}^*$ zu verkürzen, wird angenommen, dass eine Konformationsänderung der Lhc-Proteine, die durch Protonierung bestimmter Aminosäuren induziert wird, die Lebenszeit des Anregungszustandes verkürzt (Gilmore, 1997). Zu einer weiteren Verkürzung der Lebenszeit kommt es in Gegenwart des Zeaxanthins, entsprechend scheinen sowohl Konformationsänderungen als auch die Entstehung des Zeaxanthins zum NPQ beizutragen (Müller et al., 2001).

Zur Funktion des Zeaxanthins existieren zwei verschiedene Vorstellungen. Zum einen könnte Zeaxanthin als allosterischer Regulator den Übergang der Lhc-Proteine von einer Energie-transferierenden in eine Energie-dissipierende Konformation bewirken, wobei diese Konformationsänderung die Energie-Dissipation in Form von Wärme begünstigen könnte (Müller et al., 2001). Zum anderen ist aber auch ein Energietransfer von $^1\text{Chl}^*$ auf Zeaxanthin möglich (Polívka et al., 1999; Frank et al., 2000). Auf mögliche Zeaxanthin-Bindestellen in den Lhc-Proteinen wird an anderer Stelle noch eingegangen (Kap. 1.1.7).

Mutationsanalysen an *Arabidopsis* zeigten weiterhin, dass eines der Lhc-Proteine von PSII, das PsbS, essentiell für qE ist (Li et al., 2000), wobei auch die Rolle dieses Proteins noch nicht geklärt ist.

1.1.5 Kristallstruktur

Die Struktur des LHCIIB konnte durch Elektronenkristallographie zweidimensionaler Kristalle weitgehend aufgeklärt werden (Kühlbrandt et al., 1994). Aufgrund der Sequenzhomologien wird für die in Tab. 1.1 genannten Lhc-Proteine von einer ähnlichen Struktur ausgegangen. Eine Ausnahme bildet PsbS, das vier anstelle von drei Transmembranhelices aufweist.

Die Auflösung der Strukturdaten betrug $3,4 \text{ \AA}$ und erlaubte die Lokalisierung von 12 Chlorophyllen, zwei Carotenoidmolekülen und von über 80 % des Polypeptids. Der N-Terminus bis einschließlich Aminosäure 25, die letzten acht C-terminalen Reste, sowie die Aminosäuren in Position 101-115 konnten nicht lokalisiert werden (Kühlbrandt et al., 1994).

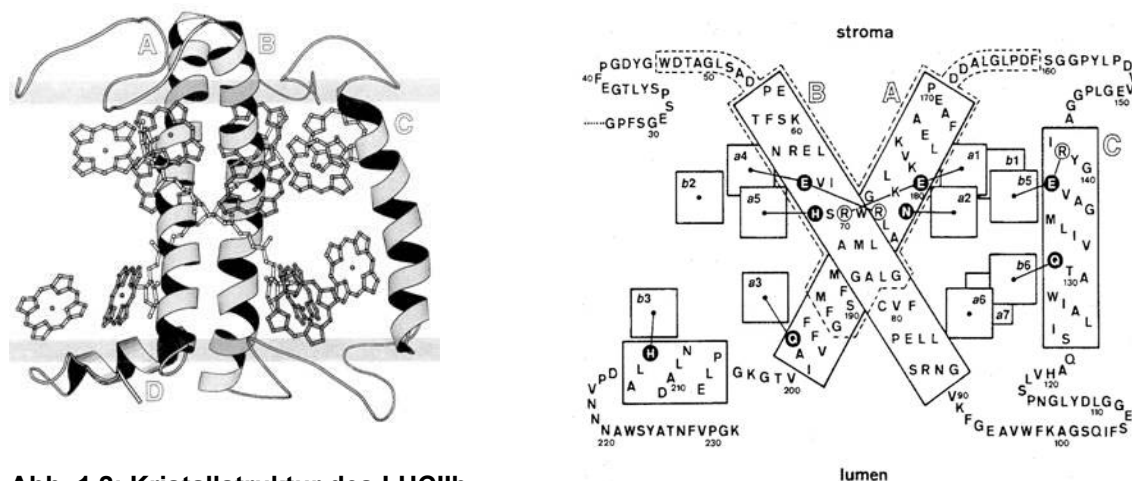


Abb. 1.2: Kristallstruktur des LHCIIB.

Abbildungen entnommen aus Kühlbrandt et al., 1994. Dargestellt ist das räumliche Modell eines LHCIIB-Monomers (Lhcb1) (links), sowie ein Modell mit Aminosäuresequenz (rechts). Die grauen Balken im linken Abbildungsteil geben die Grenzen der Lipid-Doppelschicht an.

Der LHCIIB enthält drei Transmembranhelices, wobei Helix B und A das Zentrum des Pigment-Protein-Komplexes bilden. Sie durchspannen die Membran nicht in senkrechter Orientierung, sondern sind jeweils in entgegengesetzter Richtung leicht geneigt und winden sich linksgängig umeinander. Der geringste Abstand zwischen den beiden

Transmembranhelices besteht im Bereich der Reste S69 bis A76 (Helix B) und G184 bis M191 (Helix A). In diesem Bereich finden sich auch zwei interhelicale Ionenbrücken zwischen R70 und E180, sowie E65 und R185, die den Zusammenhalt des Supercoils stabilisieren. Die beiden Carotenoid-Moleküle im Zentrum des Komplexes fügen sich in die Gruben des Supercoils ein und scheinen als interne Verstrebungen des Pigment-Protein-Komplexes zu fungieren. Die Helix C durchspannt die Membran in vergleichsweise aufrechter Orientierung, zwischen Helix C und dem Supercoil aus Helix B und A bestehen keine Kontaktbereiche, die Anbindung erfolgt vermutlich über Pigment-Interaktionen. Das Zentrum des Pigment-Protein-Komplexes, das aus Helix B und A sowie den Carotenoiden besteht, zeichnet sich durch eine auffällige Symmetrie aus. Die ausgeprägten Sequenz-Homologien zwischen diesen beiden Helices führten zu der Vermutung, dass sie durch Duplikation eines gemeinsamen Vorfahren entstanden sind (Kühlbrandt et al., 1994). Weitere Hinweise auf die Evolution der Lhc-Proteine ergaben sich aus dem Auffinden von Verwandten, die nur eine Transmembranhelix besitzen (Dolganov et al., 1995; Funk et al., 1999). Zwei ursprüngliche Lhc-Proteine mit jeweils einer Transmembranhelix könnten fusioniert sein, wobei eines dieser ursprünglichen Proteine dem Vorläufer von Helix B und A entspricht, während sich Helix C aus einem zweiten Vorläufer-Protein entwickelt haben könnte (Adamska, 2001). Durch Duplikation dieses Zwei-Helix-Proteins könnte wiederum ein PsbS-ähnliches Lhc-Protein mit vier Transmembranhelices entstanden sein. Tatsächlich weisen die erste und dritte, sowie die zweite und vierte Transmembranhelix des PsbS deutliche Homologien auf (Kim et al., 1992; Wedel et al., 1992). Verlust der vierten Transmembranhelix könnte schließlich zu den Lhc-Proteinen mit drei Transmembranhelices geführt haben.

Der Großteil der Polypeptidkette (64 %) ist allerdings nicht in helicaler Form im Innern der Lipid-Doppelschicht organisiert, sondern befindet sich an der inneren (luminalen) oder äußeren (stromalen) Oberfläche der Thylakoidmembran. Dabei sind hydrophobe Seitenketten in Richtung des hydrophoben Komplexinneren orientiert, während geladene Aminosäuren nach außen in die wässrige Umgebung zeigen. Die Lokalisation der Schleifenregion zwischen Helix C und A, auf der stromalen Seite des Komplexes, war vollständig aus den kristallographischen Daten zu entnehmen, während die Schleifenregion zwischen Helix B und C, auf der luminalen Seite, nur bis A100 und ab P116 verfolgt werden konnte. Die Position der restlichen 15 Aminosäuren ist unklar (Kühlbrandt et al., 1994).

Neben den drei Transmembranhelices enthält der LHCIIb eine vierte Helix, die parallel zur luminalen Membranoberfläche verläuft. Sie hat amphipathischen Charakter, wobei die hydrophoben Reste L206 und L209 in den hydrophoben Membrankern ragen, während die sauren Reste E207 und D211 in Richtung des Thylakoidlumens zeigen (Kühlbrandt et al., 1994).

1.1.6 Pigmentbindung

Die Auflösung der Kristallstruktur erlaubte keine Unterscheidung zwischen verschiedenen Carotenoid- bzw. Chlorophyll-Molekülen. Die beiden zentralen Carotenoide im Innern des Komplexes wurden als Luteine angesprochen, da in biochemischen Analysen durchgängig zwei Lutein-Moleküle nachweisbar waren (Kühlbrandt et al., 1994). Die Zuordnung der Chlorophylle erfolgte aufgrund der Annahme, dass Chl *a*-Moleküle näher an den Carotenoiden liegen müssen als Chl *b*-Moleküle, da der Energietransfer von Chl *b* auf Chl *a* deutlich schneller erfolgt als die Bildung von Chlorophyll-Triplett-Zuständen (Kühlbrandt et al., 1994). Insgesamt wurden 7 Chl *a* und 5 Chl *b* zugeordnet, wobei Mutationsanalysen die Zuordnung der Chl *a*- bzw. Chl *b*-Bindestellen nur zum Teil bestätigen konnten (Remelli et al., 1999; Rogl et al., 1999; Yang et al., 1999). Für neun der 12 Chlorophyll-Moleküle konnten aufgrund der Kristallstruktur Liganden in der Polypeptidkette ausgemacht werden

(Kühlbrandt et al., 1994), wobei neben Histidinen (H68, H212) und Amidinen (Q131, Q197, N183) drei ladungskompensierte Glutamate, die Ionenpaare mit Argininen bilden, Chlorophylle binden. Neben den beiden, an Ionenbrücken zwischen Helix B und A beteiligten Glutamaten E65 und E180, liegt in Helix C ein weiteres Glutamat vor, das eine Salzbrücke mit einem Arginin in derselben Helix bildet (E139/R142). Chl a_6 ist vermutlich über ein Wassermolekül an das Peptidcarbonyl des Glycins in Position 78 gebunden, das keinen Wasserstoffbrückenpartner hat, da in Position 82 ein Prolin sitzt. Die verbleibenden drei Chlorophylle sind vermutlich auf ähnliche Weise an Peptidcarbonyle der Schleifenregionen gebunden (Kühlbrandt et al., 1994).

Neben zwei Lutein-Molekülen bindet LHCIIB ein Neoxanthin, sowie ein Violoxanthin, das allerdings während der Aufreinigung sehr leicht verloren geht und daher vermutlich peripher an den Komplex gebunden ist (Ruban et al., 1999). Durch Mutationsanalysen und spektroskopische Messungen wurde die Neoxanthinbindestelle zwischen Helix C und dem Supercoil aus Helix A und B lokalisiert, wobei die Polykette, wie im Falle der Lutein-Moleküle, gegenüber der Membrannormalen geneigt ist (Croce et al., 1999). Anhand der Strukturdaten lässt sich die Bindung eines der Luteine (L1) an Q197 auf der luminalen Seite des Komplexes und zwischen S160 und L164 auf der stromalen Seite vermuten, die Bindestellen für das zweite Lutein (L2) liegen vermutlich zwischen D47 und A49 auf der stromalen und zwischen W97 und A100 auf der luminalen Seite des Komplexes (Kühlbrandt et al., 1994), wobei eine Verifikation durch Mutationen der Bindestellen nicht möglich war, da in diesen Mutanten stets auch die Chl-Bindung beeinträchtigt ist (Formaggio et al., 2001).

1.1.7 Konservierte Aminosäuren

Die meisten und die am stärksten konservierten Reste befinden sich in den Transmembranhelices, aber auch in den Extramembran-Domänen gibt es Bereiche, die in allen Chl a/b -bindenden LHC-Proteinen konserviert sind (Green et al., 1995). Für diese konservierten Bereiche wird eine Beteiligung an der Pigment-Bindung vermutet (Green et al., 1995). Der N-proximale Abschnitt von P39 bis L51 befindet sich in der Nähe von Chl a_4 und einer Lutein-Kopfgruppe (L2), W97 bis G101 in der luminalen Schleife ist unterhalb von Chl a_6 , Chl a_7 und der zweiten Kopfgruppe des Luteins (L2) lokalisiert. Die obere Kopfgruppe des spiegelsymmetrisch angeordneten Luteins (L1) sowie Chl a_1 befindet sich nahe des konservierten Bereiches Y156 bis L166 in der stromalen Schleifendomäne, die untere Kopfgruppe des L1, sowie die Chlorophylle a_3 und b_3 werden durch die kurze amphipathische Helix D vor der wässrigen Umgebung abgeschirmt, die in allen Chl a/b -bindenden Proteinen bis auf Lhcb6 konserviert ist (Green et al., 1995).

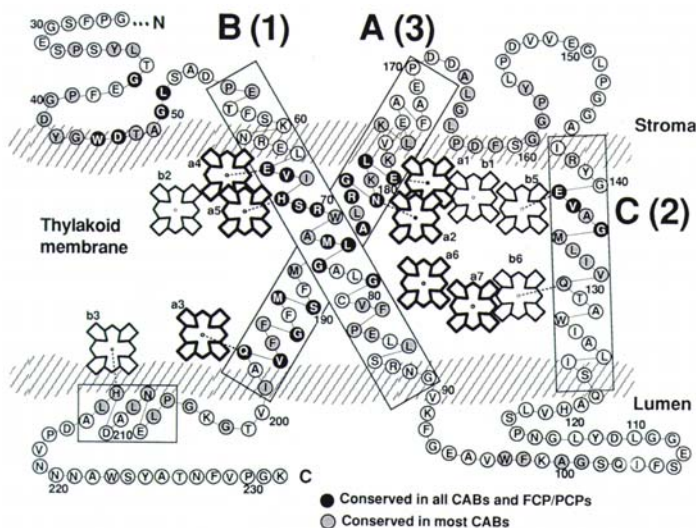


Abb. 1.3: Konservierte Aminosäuren in Chl a/b - und Chl a/c -bindenden LHC-Proteinen.

Abbildung entnommen aus Green et al., 1996. CABs: Chl a/b -bindende LHC-Proteine. FCP/PCPs: Chl a/c -bindende LHC-Proteine.

1.1.8 Stabilität

Generell wird den Wechselwirkungen zwischen einzelnen Transmembran-Helices der größte Beitrag zur Stabilität der Tertiärstruktur zugeschrieben (Haltia et al., 1995; White et al., 1999). Diese Annahme scheint zunächst auch auf den LHCIIb zuzutreffen, wobei allerdings nur die erste und dritte Transmembranhelix in direktem Kontakt miteinander zu stehen scheinen. Die Anbindung der zweiten Helix wird möglicherweise durch Pigmente vermittelt, die auch während der Rekonstitution eine entscheidende Rolle spielen (Paulsen et al., 1993; Horn et al., 2002). Nach dem zweistufigen Faltungsmodell von Popot und Engelmann (Popot et al., 1990; 2000) bilden sich die Transmembranhelices als eigenständige Faltungseinheiten, die in einem zweiten Schritt assemblieren. Der finale Gehalt an α -Helix wird im Falle des LHCIIb jedoch nur erreicht, wenn die erforderlichen Pigmente in der Rekonstitutionslösung anwesend sind (Paulsen et al., 1993; Horn et al., 2002).

Obwohl Pigmente die Rekonstitution des LHCIIb induzieren, führt der Verlust einzelner Chlorophyll-bindender Aminosäuren jedoch nicht unweigerlich zum Verlust der Rekonstitutionsfähigkeit (Formaggio et al., 2001; Remelli et al., 1999; Rogl et al., 1999; Yang et al., 1999). Genauso ist es möglich, Komplexe zu erhalten, in denen nur eine der beiden zentralen Lutein-Bindestellen besetzt ist (Formaggio et al., 2001), bzw. ließen sich Lhcb1-Mutanten rekonstituieren, in denen nur jeweils eine der beiden zentralen Ionenbrücke ausgebildet werden konnte (Yang et al., 1999; Formaggio et al., 2001).

Im Gegensatz dazu zeigte sich in Deletionsexperimenten, dass N- und C-terminale Bereiche des Lhcb1-Proteins, sowie die vollständige stromale Schleifendomäne für eine erfolgreiche Rekonstitution vonnöten sind, obwohl sie nicht direkt an der Pigment-Bindung beteiligt zu sein scheinen (Cammarata et al., 1992; Paulsen et al., 1992, 1993a; Schmeil, 1992). Es ist daher davon auszugehen, dass die Stabilität des LHCIIb weniger durch einzelne stabilisierende Wechselwirkungen, wie z.B. einzelne Ionenbrücken oder einzelne Pigment-Protein-Wechselwirkungen, definiert ist, sondern dass zahlreiche und vielfältige Interaktionen synergistisch die Tertiärstruktur des Lhcb1-Proteins definieren (Cammarata et al., 1992; Paulsen et al., 1992). Im Falle der Chlorophyll-Moleküle könnten, neben Wechselwirkungen mit den jeweiligen Liganden, schwächere Interaktionen der peripheren Gruppen des Dihydroporphyrin-Ringes, wie z.B. der 13^1 -oxo- oder der 13^2 -Carbomethoxy-Gruppen, mit der Polypeptidkette bestehen (Paulsen et al., 1997).

1.1.9 Stabilisierende Funktion der stromalen Schleifendomäne

Im Gegensatz zu Bakteriorhodopsin, in dem extramembrane Schleifendomänen im Vergleich zu Transmembranbereichen eine untergeordnete Rolle für die Stabilität der Tertiärstruktur zu spielen scheinen und verschiedene Veränderungen zulassen (Allen et al., 2001; Gilles-Gonzalez et al., 1991; Huang et al., 1981; Kahn et al., 1992; Kim et al., 2001; Liao et al., 1983; Marti et al., 1998; Teufel et al., 1993), zeigte sich, dass eine Deletion im Bereich der stromalen Schleife des LHCIIb zu einem Verlust der Rekonstitutionsfähigkeit führen kann (Schmeil, 1992).

Einen noch stärkeren Hinweis darauf, dass Schleifendomänen an der Stabilisierung des LHCIIb beteiligt sind, lieferte eine Mutationsanalyse, bei der zufällige Mutationen u. a. in die stromale Schleifendomäne eingefügt wurden (Heinemann et al., 1999). Dabei zeigte sich, dass der Austausch einzelner Aminosäure in dieser Domäne einen signifikanten Stabilitätsverlust zur Folge haben konnte. Wie oben erwähnt, sind auch in den Schleifendomänen des LHCIIb konservierte Motive zu finden, die an der Pigmentbindung beteiligt sein könnten. Lediglich im Falle des P163 betraf der Austausch jedoch eine Position, die in den meisten Chl *a/b*-bindenden Lhc-Proteinen konserviert ist (Green et al., 1996). Daneben wurde G146 ausgetauscht, eine Aminosäure innerhalb des I₁₄₃AGGPLG₁₄₉-Motivs, das lediglich in Lhcb1-

3 konserviert ist, und für das eine Beteiligung an der Bindung von Chl b_1 vermutet wird (Green et al., 1995). Die anderen beiden Austausche (D153 und L155) betrafen Aminosäuren, denen bislang keine spezielle Funktion zugesprochen wurde (Heinemann et al., 1999).

Auch in der dritten Transmembranhelix konnten in der gleichen Mutationsanalyse lediglich vier destabilisierende Aminosäureaustausche beobachtet werden (Heinemann et al., 1999), was darauf hindeutet, dass der stromalen Schleifendomäne eine ähnlich große Bedeutung während der Stabilisierung des LHCIIb zukommt wie der dritten Transmembranhelix.

1.1.10 Regulative Funktion der luminalen Schleifendomäne

Wie oben erwähnt, beinhaltet ein Schutzmechanismus der Pflanze vor photooxidativer Schädigung der Photosysteme die Deepoxidierung des Violaxanthins zum Zeaxanthin. Als eine der möglichen Bindestellen des Violaxanthins, an denen die Deepoxidierung zum Zeaxanthin stattfinden könnte, wird die interne Bindestelle L2 diskutiert (Bassi et al., 2000; Morosinotto et al., 2002; Jahns et al., 2001), und in diesem Zusammenhang könnte der luminalen Schleife der Lhc-Proteine eine regulative Funktion zukommen (Bassi et al., 2000). Wie oben erwähnt, gibt es Hinweise darauf, dass Konformationsänderungen, die durch Protonierungen bestimmter Aminosäuren induziert werden, am qE beteiligt sind. Möglicherweise ist die Konformation der luminalen Schleife und damit die Zugänglichkeit der Bindestelle L2 pH-reguliert (Bassi et al., 2000).

Die luminal Schleife der Lhcb1-3 Proteine enthält drei saure Aminosäuren an den Positionen 94, 107 und 111), die an einem solchen Regulationsmechanismus beteiligt sein könnten. Ein Nachweis protonierbarer Reste durch die Bindung von Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) gelang im Falle des trimeren LHCIIb nicht, in der luminalen Schleife des monomeren LHCIIc konnten dagegen eine DCCD-bindende Aminosäuren identifiziert werden (Walters et al., 1996). Dabei handelte es sich um eine Aminosäure, die auch im LHCIIb konserviert ist (E94). Die luminal Schleife des LHCIIc enthält lediglich eine weitere saure Aminosäure (Jansson et al., 1994), die nicht durch DCCD gebunden wurde (Walters et al., 1996).

Da möglicherweise der unterschiedliche Oligomerisierungszustand zu Unterschieden in der Markierbarkeit der Position E94 in LHCIIb und LHCIIc führte (Walters et al., 1996), erscheint die Protonierbarkeit der Aminosäure E94 des LHCIIb weiterhin möglich. E107 und D111 befinden sich in einem Bereich, in dem LHCIIb und LHCIIc größere Unterschiede aufweisen (Jansson et al., 1994), weshalb das negative Ergebnis für die zweite saure Aminosäure in der luminalen Schleife von LHCIIc keine Rückschlüsse auf die Protonierbarkeit von E107 und D111 in LHCIIb erlaubt. Direkte Hinweise darauf, dass die luminal Schleife des LHCIIb an der Regulation des qE beteiligt ist, und dass dabei die Protonierung der Aminosäuren E94, E107 und D111 eine Rolle spielt, liegen allerdings bislang nicht vor.

1.2 In vitro-Evolution zur Steigerung der Stabilität des LHCIIb

Die bisherige Datenlage zur Stabilität des LHCIIb erlaubt keine verlässlichen Prognosen bzgl. des Effektes einer bestimmten Mutation, genauso wenig, wie sich aus den bisher vorliegenden Daten zur Stabilitätsverbesserung von Membranproteinen (Bowie, 2001) eine sinnvolle Vorgehensweise ableiten lässt. Ein evolutiver Ansatz, die Selektion stabilerer Mutanten aus einer großen Anzahl an Zufallsmutanten, stellte daher eine attraktive Alternative dar.

Heinemann et al., 1999, beschrieben eine Methode, die die Expression des Lhcb1, die Rekonstitution mit Pigmenten und die Untersuchung der Mutanten in einem Reaktionsgefäß erlaubte. Mithilfe dieser Methode konnten mehrer Tausend Mutanten bezüglich ihrer Rekonstitutionsfähigkeit überprüft werden. Eine deutliche Steigerung der Durchsatzrate

könnte allerdings erreicht werden, wenn nicht jede Mutante einzeln gemustert werden müsste, sondern eine Selektion bezüglich einer bestimmten Eigenschaft erreicht werden könnte.



Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Screening- bzw. Selektionsverfahrens.
Mutanten, die die gewünschte Eigenschaft zeigen, sind dunkel dargestellt.

Insbesondere falls nur wenige Mutanten die gewünschte Eigenschaft zeigen, kann sich die einzelne Durchmusterung als mühsames Unterfangen erweisen und es bietet sich an, die Durchsatzrate mithilfe eines Selektionsverfahrens zu steigern.

1.2.1 Phage-Display

Eine Selektion auf Protein-Ebene würde zwar zur Isolierung der gewünschten Proteine führen, eine Amplifizierung wäre allerdings ohne gleichzeitige Isolierung der cDNA nur auf kostspieligen Umwegen möglich. Speziell für diese Art der Anwendung wurde daher eine Expressionsmethode entwickelt (Smith, 1985) bei der die Proteine auf einer Bakteriophagenhülle exponiert werden, wobei sich die cDNA im Capsid des Bakteriophagen befindet. Bei diesem sog. „Phage-Display“ trägt jedes Protein seine zugehörige cDNA stets bei sich und diese wird zusammen mit dem Protein selektiert.

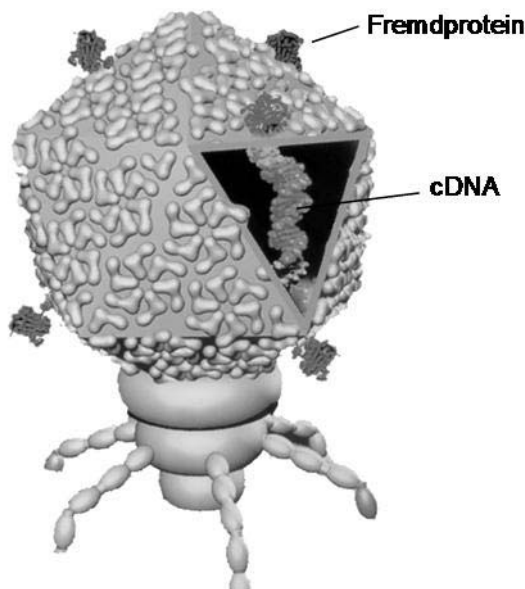


Abb. 1.5: T7-Partikel mit exponiertem Fremdprotein.

Abbildung (verändert) nach Novagen (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.).

Ein Phage-Display von Peptiden und Proteinen kann die Bearbeitung einer Vielzahl von Fragestellungen erleichtern, darunter die Identifizierung von Proteinen mit bestimmten Eigenschaften aus einer cDNA-Bibliothek, oder die Lokalisierung einer bestimmten Funktion innerhalb eines Proteins (Kay et al., 1996). Genauso wurde diese Methode bereits mit Erfolg dazu eingesetzt, Mutanten mit bestimmten Eigenschaften zu selektieren (Kay et al., 1996).

Die Schwierigkeit eines Selektionsverfahrens besteht darin, eine Sortierung der gewünschten und der unerwünschten Mutanten zu erreichen. Am einfachsten ist eine Selektion von

Mutanten mit bestimmten Bindeeigenschaften, die ausgenutzt werden können, um diese gewünschten Mutanten zu immobilisieren, während die unerwünschten durch Waschen entfernt werden können (Biopanning). Durch mehrere Biopanning-Runden, die hintereinander durchgeführt werden, können unerwünschte Mutanten abgereichert werden.

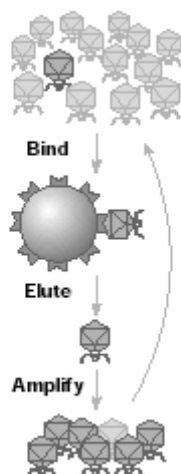


Abb. 1.6: Prinzip des Biopannings.
Rosenberg et al., 1996

Im Falle einer angestrebten Stabilitätssteigerung liegt das Selektionsmerkmal dagegen nicht unmittelbar auf der Hand. Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich daher mit der Frage, wie stabile Mutanten des LHCIIB selektiert werden könnten.

1.2.2 T7Select 10-3b

Mittlerweile existiert eine große Vielfalt an Phage-Display-Vektoren, wobei ein Großteil der Systeme filamentöse Bakteriophagen als Vektoren nutzt (Swanson, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen ein System verwendet, das auf dem icosahedralen *E. coli*-Bakteriophagen T7 basiert (T7Select 10-3b, Novagen, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.). Dieser Bakteriophage hat ein doppelsträngiges, lineares DNA-Genom, wächst schneller als filamentöse Phagen, und ist deutlich widerstandsfähiger z.B. gegenüber SDS, wobei die Empfindlichkeit gegenüber niedrigen pH-Werten allerdings höher ist als bei filamentösen Phagen (Rosenberg et al., 1996). T7 ist ein lytischer Bakteriophage, d.h., der Aufbau der Bakteriophagenpartikel erfolgt im Cytoplasma der Bakterienzelle, woraufhin die Zelle lysiert und die Bakteriophagen in das umgebende Medium entlässt.

Das Capsid des Bakteriophagen T7, mit einem Durchmesser von 60 nm, besteht aus 415 Kopien des Capsid-Proteins (p10) (Steven et al., 1986), wobei dieses Capsid-Protein natürlicherweise in zwei Formen vorkommt: 10A (344 Aminosäuren) und 10B (397 Aminosäuren). 10B enthält im Vergleich zu 10A einen verlängerten C-Terminus und entsteht durch eine Verschiebung des Leserasters während der Translation (Dunn et al., 1983; Condrón et al., 1991). Die Phagenhülle wird aus 415 Kopien des p10 zusammengesetzt (Steven et al., 1986) und enthält normalerweise etwa 10% 10B (Condrón et al., 1991). Funktionale Capside können aber auch ausschließlich aus 10A oder 10B bzw. aus verschiedenen Anteilen der beiden Proteine aufgebaut werden (T7Select Handbuch, Novagen, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.). Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass der verlängerte C-Terminus des 10B keine strukturelle Funktion besitzt und sich an der äußeren Oberfläche des Capsids befindet (T7Select Handbuch, Novagen, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.). Die Expression eines Fremdproteins als Fusion an

p10 behindert daher den Aufbau der Capside nicht und führt zur Exposition des Fremdproteinanteils auf der Bakteriophagenhülle.

Die cDNA des Fremdproteins wird in eine „multiple cloning site“ im Anschluss an Aminosäure 348 des 10B-Proteins ligiert. Die Ligationsprodukte können *in vitro* in infektiöse Phagenpartikel verpackt werden. (Zum *In vitro*-Packaging von T7 DNA vgl. Son et al., 1988). Nach Infektion einer Wirtszelle kommt es zum Aufbau neuer Phagenpartikel, wobei die codierten Fusionsproteine eingebaut werden. Bei Fremdproteinen einer Länge von mehr als 50 Aminosäuren können die Capside nicht ausschließlich aus Fusionsproteinen aufgebaut werden. Es müssen daher Wirtszellen verwendet werden, die unfusioniertes p10 zur Verfügung stellen. Rein statistisch kommt es dabei zum Einbau von 5-15 Fusionsproteinen pro Capsid (T7Select Handbuch, Novagen, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.).

Für erfolgreiche Selektionen aus T7-Bibliotheken gibt es ebenfalls Beispiele, so wurden z.B. die Epitope von Antikörpern charakterisiert (Houshmand et al., 1999), Interaktionen von Peptiden mit dem angeborenen Immunsystem untersucht (Sokoloff et al., 2000) und Bindungspartner des Epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) identifiziert (Zozulya et al., 1999).

1.3 Problemstellung

Diese Arbeit stand in Zusammenhang mit dem Ziel, eine Stabilitätsverbesserung des LHCIIB durch Mutationen des Polypeptidrückgrates zu erreichen. Eine Stabilitätsverbesserte Mutante des LHCIIB wäre zum einen für eine technische Anwendung des LHCIIB in der Photovoltaik interessant, würde aber auch die Durchführung Zeitaufwändiger Messungen erlauben und damit die Untersuchungsmöglichkeiten des LHCIIB erweitern. Weiterhin ließen sich aus stabilisierenden Aminosäureaustauschen generelle Strategien für die Stabilitätsverbesserung von Membranproteinen ableiten, ein Gebiet, auf dem noch einiger Forschungsbedarf besteht.

Prinzipiell ist davon auszugehen, dass die maximale Stabilität des LHCIIB unter physiologischen Bedingungen nicht unbedingt erstrebenswert ist. Wie eingangs erwähnt, stellen Lichtsammelproteine gerade bei hoher Lichteinstrahlung ein Problem für die Pflanzen dar und werden z.B. durch Mechanismen des „Non photochemical quenching“ adaptiv an wechselnde Lichtbedingungen angepasst. Es ist daher davon auszugehen, dass diese Adaptivität im Laufe der Evolution optimiert wurde, während maximale Stabilität unter physiologischen Bedingungen nicht unbedingt erforderlich ist, und unter Umständen adaptive Anpassungen, wie z.B. Konformationsänderungen, sogar verhindert. Da das Ziel zudem eine erhöhte Stabilität unter *in vitro*-Bedingungen war, die sich z.B. in der Anwesenheit von Detergens von der natürlichen Umgebung unterscheiden, erscheint eine Optimierung der Stabilität durch Veränderung des Polypeptidrückgrates als möglich.

Mutationsanalysen deuten bislang daraufhin, dass die Stabilität des LHCIIB weniger auf einzelnen stabilisierenden Elementen als vielmehr auf dem Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren beruht. Gezielte Mutationen zur Stabilitätsverbesserung erscheinen daher wenig Erfolg versprechend, da die Effekte eines Eingriffs in ein synergistisches System kaum vorhersehbar sind.

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war die Entwicklung eines Selektionssystems, das die Selektion stabiler Mutanten aus einer großen Anzahl von Zufallsmutanten erlaubt. Der Erfolg eines solchen Selektionssystems beruht auf der Grundannahme, dass prinzipiell eine Stabilitätsverbesserung des LHCIIB durch Mutation des Polypeptidrückgrates möglich ist. Da weiterhin nicht bekannt ist, wie häufig stabilisierende Aminosäureaustausche sind, wurde, im Gegensatz zu einem Screening-System mit beschränkter Durchsatzrate, ein System angestrebt, das eine tatsächliche Selektion stabiler Mutanten erlauben sollte. Ein solches

Selektionssystem wäre möglicherweise auch einsetzbar, um andere Eigenschaften des LHCIIB, wie z.B. die Pigmentbindung, zu verändern. Zu diesem Zweck war die Expression des Lhcb1 als Phage-Display und die Rekonstitution des LHCIIB auf der Phagenhülle notwendig.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob, und in welcher Form die zweite Schleifendomäne des LHCIIB, die an der luminalen Oberfläche der Thylakoidmembran lokalisiert ist, zur Stabilisierung des Pigment-Protein-Komplexes beiträgt. In einer Mutationsanalyse, die von K. Eggert in Zusammenarbeit mit B. Heinemann durchgeführt wurde (Eggert, 2000), wurden einige Aminosäureaustausche in der luminalen Schleifendomäne identifiziert, deren destabilisierender Effekt offensichtlich nicht unter allen Bedingungen der gleiche war. Der Effekt der verschiedenen Austausch wurde mithilfe mehrerer Methoden verglichen, um Aufschluss über die spezifische Bedeutung einzelner Aminosäuren in dieser strukturell noch ungeklärten Region zu erhalten. Daneben sollten diese detaillierten Untersuchungen zeigen, ob die unterschiedlichen Stabilitäten unter verschiedenen Bedingungen miteinander in Verbindung stehen und möglicherweise durch unterschiedliche Stringenzen der Untersuchungsmethoden zu erklären sind, oder ob die destabilisierenden Effekte der Mutationen in verschiedenen Untersuchungsmethoden unterschiedlich stark gewichtet werden. Das Zutreffen der zweiten Möglichkeit würde zu einer differenzierteren Betrachtungsweise des Begriffes „Stabilität“ führen, die insbesondere in Zusammenhang mit der angestrebten Selektion stabiler Mutanten berücksichtigt werden müsste.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Geräte

Die verwendeten Chemikalien waren, falls nicht anders vermerkt, von p.a. Qualität. Sie wurden hauptsächlich von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Biomol GmbH, Hamburg
BioRad, München
Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.
Chemicon International Ltd, Hofheim/Ts.
Cognis Deutschland GmbH Co. KG, Düsseldorf
Greiner Labortechnik, Frickenhausen
ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Macherey-Nagel, Düren
Merck KGaA, Darmstadt
Mobitec, Göttingen
Molecular Probes, Eugene, OR, USA
MWG Biotech AG, Ebersberg
NEB, Frankfurt
Novagen, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.
PALL Gelman Science GmbH, Dreieich
Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA
Promega GmbH, Mannheim
Roche Applied Science, Mannheim
Roth, Karlsruhe
Stratagene, La Jolla, CA, USA
Serva Electrophoresis, Heidelberg
Sigma, Taufkirchen
Takara Shuzo CO., LTD, Shiga, Japan

Folgende Geräte wurden verwendet:

Autoklav

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

Digitalthermostat

- Ministat Compatible Control, Huber Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg-Elgersweiler

Zellpresse

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

Fluoreszenzspektrometer

- FluoroMax-2 und FluoroMax-3, Jobin Yvon Spex Instruments S.A. Inc., Frankreich
Software: Datamax Version 2.24/Grams 32

Geldokumentationsanlage

- VersaDoc Imaging System Model 3000, BioRad, München

Geltrocknungsanlage

- Slab Gel Dryer 2003, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

HPLC

- 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-Detektor
Spannungsgeber: LC-NetII/SCD
Software: Jasco-PDA, BORWIN, Version 1.5
Alle Geräte von Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt
Säule: Chromolith Speed ROD, RP 18e-50-4,6, Merck KGaA, Darmstadt

Kühlgerät

- Fisons D1/GH, Haake Messtechnik GmbH, Karlsruhe

Kühlzentrifugen

- J2-HS, Beckman Instruments GmbH, München. Rotoren: JLA 10500, JA20
- Universal 30 RF, Hettich, Tuttlingen. Rotoren: 1414 (50 ml-Röhrchen), 1412 (Eppendorfgefäße), 1422 (Mikrotiterplatten)

Kulturenschüttler

- Certomat H, B.Braun Biotech International, Melsungen

Magnetrührer

- IKAMAG RCT, IKA Labortechnik, Staufen
- IKA-COMBIMAG RET, IKA Labortechnik, Staufen
- MR 3001 K, Heidolph, Kelheim

Mikrowellengerät

- Siemens, München

Mischgerät

- Vortex Genie 2, Bachhofer, Reutlingen

PCR-Geräte

- Primus, MWG-Biotech, Ebersberg
- Mastercycler S 330, Eppendorf, Hamburg

pH-Meter

- inoLab pHLevel 2, WTW GmbH, Weilheim

Photometer

- V-550 UV/Vis Spektralphotometer, Jasco Labor- und Daten Technik GmbH, Groß-Umstadt
- UV-2101PC, Shimadzu, Kyoto, Japan
- SpectraMax Plus, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA

Reinstwasseranlage

- Optilab-Standard, MembraPure, Lörzweiler

Rotationsvorrichtungen

- Kulturenrad, Bachhofer, Reutlingen
- Rührwerk, Heidolph, Kelheim

Rotationsverdampfer

- Rotovapor RE111, Büchli, Flawil, Schweiz

Schüttelgeräte

- Phero-Shaker, Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen
- IKA-VIBRAX-VXR, Bachhofer, Reutlingen

Spannungsgeräte

- Microcomputer Electrophoresis Power Supply, Consort
- PowerPac 300, BioRad, München
- EPS 301, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
- Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen

Sterilbank

- SLEE Semiconductor Technik GmbH, Mainz

Tischzentrifugen

- Bachhofer, Reutlingen
- EBA 12, Hettich, Tuttlingen

Ultraschallbad

- Sonorex Super RK102H, Bandelin, Berlin

Ultrazentrifugen

- Optima XL-100K, Beckman Instruments GmbH, München. Rotor SW41-Ti
- Centrikon T-1065, Kontron Instruments, Neufahrn
- Airfuge, Beckman Instruments GmbH, München. Rotor A-110

Vakuum-Trocknungsanlage

- Vacuum Concentrator, Bachhofer, Reutlingen

Waagen

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

Wärmeschrank

- Memmert, Schwalbach

Wasserbäder

- Thermomix MM, B. Braun Biotech International, Melsungen
- HB 4basic, IKA Labortechnik, Staufen

2.2 Klone

Klon	Charakterisierung	Vektor	Herstellung/Hersteller
15h.10	Lhcb1 ΔK3/S4 mit <i>SacI</i> - und <i>SphI</i> -Restriktionsschnittstelle in Position ⁸³ GluLeu ⁸⁴ bzw. ¹²³ SerMetLeu ¹²⁵ . Aminosäureaustausch I124M.	vgl. 1n.1	B. Heinemann
1n.1	pLhcb1	pDS12 RBSII-2 enthält <i>PstI</i> I- <i>SacI</i> -Fragment aus Bluescript-Polylinker	H. Paulsen
39a.2	Lhcb1, N-Terminus bis einschließlich Aminosäure 15 und C-Terminus nach 1. TM-Helix deletiert	vgl. 1n.1	H. Paulsen
C2.4h	pLhcb1 mit C-terminalem His-Tag	vgl. D7f.3	K. Kosemund
C3.2h	Lhcb1 mit C-terminalem His-Tag	vgl. D7f.3	K. Kosemund
D111V	15h10 mit dem Aminosäureaustausch D111V	vgl. 1n.1	K. Eggert, vgl. auch Kap. 3.4.1 dieser Arbeit
D7f.3	Lhcb1	wie 1n.1 ohne <i>PstI</i> - <i>PstI</i> -Fragment	H. Dilly-Hartwig
D7f.3-BamHI	Lhcb1 mit T7-verträglicher <i>BamHI</i> -Schnittstelle am N-Terminus und C-terminalem His-Tag, sowie <i>XmaI</i> -Schnittstelle. <i>SphI</i> -Schnittstelle am N-Terminus ist nicht mehr vorhanden.	vgl. D7f.3	vgl. Kap. 2.5.2.3
D7f3.hBFse	D7f.3-BamHI mit C79S und <i>FseI</i> - und <i>BstBI</i> -Schnittstellen vor der 1. Transmembranhelix	vgl. D7f.3	<i>SacI</i> - <i>BstEII</i> -Fragment aus Sch4 in D7f.3-BamHI vgl. Kap. 2.5.2.4
D7f3BamHISphI	D7f.3-BamHI mit <i>SphI</i> -Schnittstelle am Ende der zweiten Helix. Aminosäureaustausch I143H Verlust eines Nukleotids in der <i>BstEII</i> -Erkennungssequenz. Leserasterverschiebung ab	vgl. D7f.3	<i>BstEII</i> - <i>XmaI</i> -Fragment aus GlySerSphI in D7f.3-BamHI

	E139		
D7f3BSF	D7f.3-BamHISphI mit <i>FseI</i> -Schnittstelle nach Aminosäure 24 (Zählung nach Kühlbrandt et al., 1994). Aminosäureaustausche: K23A und Y24G	vgl. D7f.3	vgl. Kap. 2.5.2.6
E107V	15h10 mit dem Aminosäureaustausch E107V	vgl. 1n.1	K. Eggert, vgl. auch Kap. 3.4.1 dieser Arbeit
E207G	C3.2h mit den Aminosäureaustauschen I143H und E20G	vgl. D7f.3	<i>BstEII-XmaI</i> -Fragment aus T7 GlySerSphI nach Mutagenese und Selektion (Experiment 1) in C3.2h
E94G	15h10 mit dem Aminosäureaustausch E94G	vgl. 1n.1	K. Eggert, vgl. auch Kap. 3.4.1 dieser Arbeit
G101R	15h10 mit dem Aminosäureaustausch G101R	vgl. 1n.1	K. Eggert, vgl. auch Kap. 3.4.1 dieser Arbeit
G109R	15h10 mit dem Aminosäureaustausch G109R	vgl. 1n.1	K. Eggert, vgl. auch Kap. 3.4.1 dieser Arbeit
G114D	15h10 mit dem Aminosäureaustausch G114D	vgl. 1n.1	K. Eggert, vgl. auch Kap. 3.4.1 dieser Arbeit
G184S	D7f.3 mit dem Aminosäureaustausch G184S	vgl. D7f.3	B. Heinemann
G89S	15h10 mit dem Aminosäureaustausch G89S	vgl. 1n.1	K. Eggert, vgl. auch Kap. 3.4.1 dieser Arbeit
GlySer9	N-Terminus von D7f3hBFse bis einschließlich T48 ersetzt durch (G ₄ S) ₂	vgl. D7f.3	vgl. Kap. 2.5.2.5
GlySerSphI	GlySer9 mit <i>SphI</i> -Schnittstelle am Ende der zweiten Helix. Aminosäureaustausch I143H	vgl. D7f.3	vgl. Kap. 2.5.2.6
H120L	15h10 mit dem Aminosäureaustausch H120L	vgl. 1n.1	K. Eggert, vgl. auch Kap. 3.4.1 dieser Arbeit
H120Y	15h10 mit dem Aminosäureaustausch H120Y	vgl. 1n.1	K. Eggert, vgl. auch Kap. 3.4.1 dieser Arbeit
I143H	C3.2h mit dem Aminosäureaustausch I143H	vgl. D7f.3	<i>BstEII-XmaI</i> -Fragment aus T7 GlySerSphI in C3.2h
N115Y	15h10 mit dem Aminosäureaustausch N115Y	vgl. 1n.1	K. Eggert, vgl. auch Kap. 3.4.1 dieser Arbeit
N183D	C3.2h mit den Aminosäureaustauschen I143H und N183D	vgl. D7f.3	<i>BstEII-XmaI</i> -Fragment aus T7 GlySerSphI nach Mutagenese und Selektion (Experiment 3) in C3.2h
Q122H	15h10 mit dem Aminosäureaustausch Q122H	vgl. 1n.1	K. Eggert, vgl. auch Kap. 3.4.1 dieser Arbeit
Q122L	15h10 mit dem Aminosäureaustausch Q122L	vgl. 1n.1	K. Eggert, vgl. auch Kap. 3.4.1 dieser Arbeit
S102T	15h10 mit dem Aminosäureaustausch S102T	vgl. 1n.1	K. Eggert, vgl. auch Kap. 3.4.1 dieser Arbeit

S106C	Aminosäureaustausch S106C	vgl. D7f.3	S. Storf
S160C	Aminosäureaustausch S160C, His-Tag am C-Terminus	vgl. D7f.3	C. Huschenbett
S3C	Aminosäureaustausch S3C, His-Tag am C-Terminus	vgl. D7f.3	C. Huschenbett
S52C	Aminosäureaustausch S52C	vgl. D7f.3	S. Storf
S86P	15h10 mit dem Aminosäureaustausch S86P	vgl. 1n.1	K. Eggert, vgl. auch Kap. 3.4.1 dieser Arbeit
Sch4	Lhcb1 mit C79S und <i>FseI</i> - und <i>Bst</i> BI-Schnittstellen vor der 1. Transmembranhelix	vgl. D7f.3	S. Storf
V229C	Aminosäureaustausch V229C, His-Tag am C-Terminus	vgl. D7f.3	C. Huschenbett
VM15	pLhcb1 mit T7-verträglicher <i>Bam</i> HI-Schnittstelle am N-Terminus Im Vergleich zu AB80 fehlt eines der 5 Serine am N-Terminus.	vgl. 1n.1	siehe Kap. 2.5.2.1
VM15h	pLhcb1 mit T7-verträglicher <i>Bam</i> HI-Schnittstelle am N-Terminus und C-terminalem His-Tag Im Vergleich zu AB80 fehlt eines der 5 Serine am N-Terminus.	vgl. D7f.3	<i>Eco</i> RI- <i>Bst</i> EII-Fragment aus VM15 in C3.2h vgl. Kap. 2.5.2.2
W97R	15h10 mit dem Aminosäureaustausch W97R	vgl. 1n.1	K. Eggert, vgl. auch Kap. 3.4.1 dieser Arbeit
W97Rhis	W97R mit C-terminalem His-Tag	vgl. D7f.3	<i>Eco</i> RI- <i>Bst</i> EII-Fragment aus W97R in C3.2h
ZEP Link Lhcb1	Lhcb1 mit C-terminalem His-Tag, mit Trypsin-resistentem Fragment aus der Zeaxanthin-Epoxidase aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> anstelle des N-Terminus bis einschließlich Y24.	vgl. D7f.3	Ligation des ZEP Link-Fragmentes in <i>Bam</i> HI- <i>FseI</i> Restriktionsschnittstellen des ZEP Link-Vektors
ZEP Link-Vektor	D7f3BSF mit wieder hergestellter <i>Bst</i> EII-Schnittstelle	vgl. D7f.3	vgl. Kap. 2.5.2.6

Tab. 2.1: Auflistung der verwendeten Lhcb1-Klone.

2.3 Primer und Oligonukleotide

Alle Primer und Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen.

Name	Sequenz	Beschreibung	Annealing-Temperatur
1n1-BamHI	5'-GATGATGATGCGGGATCCCTCATAGTTAATTTCTCC-3'	Antisense Bindestelle: 96-130 in 1n.1 Verschiebung der <i>Bam</i> HI-Schnittstelle	55°C
AB80-667	5'-CTTGCCATATGGGCCACTCAGGTATCTTG-3'	Sense Bindestelle: 484-513 in D7f.3	52°C
BstEII_VM	5'-CATGCCGGTAACCTTCGACAGC-3'	Antisense Bindestelle: 529-550 in D7f3BSF. Enthält <i>Bst</i> EII-Schnittstelle, endet an <i>Sph</i> I-Schnittstelle	52°C
D7f.3-	5'-	Sense	52°C

BamHI	TTAAGCATGGATCCATCTGCTACC-3'	Bindestelle: 102-126 in D7f.3 Generation einer <i>Bam</i> HI-Schnittstelle, Verlust der <i>Sph</i> I-Schnittstelle	
DS178'	5'-GGAGTTCTGAGGTCATTACTIONGG-3'	Antisense Bindestelle: 998-1019 in D7f.3	52°C
DS23⁺	5'-ATTTGCTTTGTGAGCGG-3'	Sense Bindestelle: 17-33 in 1n.1 Sequenzierprimer	55°C/52°C
DS340'	5'-CTTTACGATGCCATTGGG-3'	Antisense Bindestelle: 1159-1176 in D7f.3	52°C
Fsel mut	5'- CACCGGAGAATGGGCCAAGGCCGG CCACACGGTCTGGTCCGTAC-3'	Antisense Bindestelle: 159-202 in D7f.3	52°C
GlySer1	5'- GATCCTGGTGGAGGCGGGTCCGGA GGCGGTGGGTCGGCCGG-3'	Sense-Oligo zur Herstellung des [Gly] ₄ Ser-Fragmentes	
GlySer2	5'- CCGACCCACCGCCTCCGGACCCGC CTCCACCAG-3'	Antisense-Oligo zur Herstellung des [Gly] ₄ Ser-Fragmentes	
LHCP757' kurz	5'-TGGATCAAAGCTTCCACCTG-3'	Antisense Bindestelle: 581-600 in D7f.3	52°C
S1	5'-GATGGAGTTCTGAGG-3'	Antisense Bindestelle: 1160-1174 in 1n.1	55°C
SphI_VM	5'- CGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGG G-3'	Sense Bindestelle: 525-549 in D7f.3	52°C
T7 DOWN	5'-AACCCCTCAAGACCCGTTTA-3'	T7-Vektor Primer Antisense Bindestelle: 20498-20517 in T7Select 10-3b	50°C
T7 UP	5'-GGAGCTGTCGTATTCCAGTC-3'	T7-Vektor Primer Sense Bindestelle: 20374-20393 in T7Select 10-3b	50°C
T7_His	5'- AGCTCCCGGGTTAATGGTGATGGTG ATGGTGTTTT-3'	Antisense Bindestelle: von 22 Nukleotide vor TAA bis vier Nukleotide nach <i>Xma</i> I-Schnittstelle in T7 GlySerSphI	50°C
XmaI_VM	5'- TAAATATAAGAGTGTATTATTTCCCGG GTAA-3'	Antisense Bindestelle: 8226-855 in C3.2h	52°C
ZEP Link Primer forward	5'- ATGCTGGATCCATCTGCTGGCAGCG GATCACAGGTCTGGAGCGGCCTCG- 3'	Sense Bindestelle: 1876-1894 in Zeaxanthin Epoxidase-Gen von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Generiert eine <i>Bam</i> HI- Schnittstelle im T7 Vektor- Leseraster	58°C
ZEP Link Primer revers	5'- CCTAGGCCGGCCACACCGACTGGT CCGACCAGGTCGCTGAGCCAGTAG C-3'	Antisense Bindestelle: 2000-2020 in Zeaxanthin Epoxidase-Gen von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Generiert eine <i>Fsel</i> -Schnittstelle	58°C

Tab. 2.2: Auflistung der verwendeten Primer und Oligonukleotide.
Zählung der Nukleotide ab *Xho*I-Erkennungssequenz.

2.4 Plasmid-DNA-Arbeiten

2.4.1 Plasmid-Vektor und bakterieller Wirtstamm

Sowohl für die Expression von Lhcb1 als auch für Klonierungsarbeiten wurde ein Expressionsvektor der pDS12-Reihe (Bujard et al., 1987) verwendet, der ein Derivat des Gens AB80 aus *Pisum sativum* (Cashmore, 1984) enthält. Die Expression des Gens wird durch einen starken Phagenpromotor (P_{N25} , T5-Phage) reguliert, der unter der Kontrolle des lac-Operons steht und damit durch IPTG induzierbar ist. Das Plasmid enthält außerdem das Gen für eine β -Lactamase und erlaubt transformierten Zellen daher das Wachstum in Gegenwart des Antibiotikums Ampicillin.

Als Wirtstamm wurde *E. coli* JM101 (NEB, Frankfurt) verwendet. Genotyp: $F' traD36proA^+B^+ lacI^f \Delta(lacZ)M15/\Delta(lac-proAB) glnV thi$.

2.4.2 Agarosegelelektrophorese

Zur qualitativen Kontrolle, zur Quantifizierung oder zur Aufreinigung wurde DNA durch eine Elektrophorese in einem Agarosegel aufgetrennt. Dazu wurde die DNA-Lösung mit Auftragspuffer versetzt und auf ein Minigel (ca. 6 cm Trennstrecke) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Kammern bei 140-200 V. Als Laufpuffer wurde TBE-Puffer verwendet, der zum Anfärben der DNA mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 mg/l) versetzt war. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid konnte nach Anregung im UV fotografiert werden.

Material:

- 5 x TBE-Laufpuffer: 0,455 M Tris-Base; 0,455 M Borsäure; 10 mM EDTA. Nach Einfüllen in die Elektrophoresekammer wurden 0,5 mg/l Ethidiumbromid zugeben.
- Minigele: 0,6 – 2 % Agarose; TBE-Laufpuffer. Die Agarose wurde durch Kochen der Suspension in der Mikrowelle geschmolzen. Pro Glasplatte wurden 10 ml Agarose-Lösung aufgetragen.
- 10 x Minigel-Auftragspuffer: 0,025 % Bromphenolblau; 0,025 % Xylencyanol; 50 % Glycerin; 10 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl (pH 8)

2.4.2.1 Größenvergleich/Quantifizierung

Zum Größenvergleich bzw. zur Quantifizierung wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente mit DNA-Größenstandards verglichen.

100 bp DNA-Leiter (NEB, Frankfurt):		1 kb DNA-Leiter (NEB, Frankfurt):	
Basenpaare	Masse (bei insgesamt 0,25 μ g)	Basenpaare	Masse (bei insgesamt 0,25 μ g)
1517	22,5 ng	10002	21 ng
1200	17,5 ng	8001	21 ng
1000	47,5 ng	6001	25 ng
900	13,5 ng	5001	21 ng
800	12 ng	4001	16,5 ng
700	10,5 ng	3001	62,5 ng
600	9 ng	2000	24 ng
500/517	48,5 ng	1500	18 ng
400	19 ng	1000	21 ng
300	14,5 ng	500/517	21 ng
200	12,5 ng		
100	24 ng		

Tab. 2.3: DNA-Molekulargewichtsstandards.

2.4.2.2 Gelelution

Die Agarosegelelektrophorese wurde auch zu präparativen Zwecken verwendet. Dazu wurden die DNA-Banden anhand ihrer Fluoreszenz im schwachen UV-Licht lokalisiert und aus dem Gel ausgeschnitten. Auf eine Fotografie der Fluoreszenz wurde in diesen Fällen verzichtet. Zur Elution der DNA aus dem Gel wurde das Nucleotrap-Extraktions-Kit (Macherey-Nagel, Düren) oder das E.Z.N.A. Gel Extraktions-Kit (Peqlab, Erlangen) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

2.4.3 PCR

Bis auf spezielle Anwendungen wurde die PCR nach dem folgenden Standard-Protokoll durchgeführt:

PCR-Ansatz:

100-200 ng Plasmid-DNA; 1 μ M pro Primer; 0,2 mM pro dNTP; DNA-Polymerase Puffer 12,5-25 mU/ μ l DNA-Polymerase nach 5 min 95°C zugeben.

Verwendete DNA-Polymerasen:

- *peqGold Taq*-DNA-Polymerase (Peqlab, Erlangen)
- *Pfu*-DNA-Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA)
- *Pwo*-DNA-Polymerase (Peqlab, Erlangen)

Die Polymerasen wurden mit dem jeweils empfohlenen Puffer verwendet.

PCR-Programm:

Nach der Zugabe der Polymerase folgten 25 Zyklen:

60 sec 95°C; 60 sec Annealing-Temperatur je nach Primer (siehe Tabelle); 90 sec 72°C

Nach dem 25. Zyklus wurde die Temperatur für weitere 10 min bei 72°C belassen.

2.4.4 Restriktionen

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von den Firmen NEB (Frankfurt) und Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen. Die Restriktionen wurden in dem jeweils empfohlenen Puffer durchgeführt. Dabei wurden mindestens 5 U Enzym pro μ g DNA eingesetzt.

Enzym	Schnittstelle	Enzym	Schnittstelle
<i>Bam</i> HI	G\G A T C C C C T A G\G	<i>Sac</i> I	G A G C T\C C\T C G A G
<i>Bst</i> EII	G\G T N A C C C C A N T G\G	<i>Sal</i> I	G\T C G A C C A G C T\G
<i>Eco</i> RI	G\A A T T C C T T A A\G	<i>Sph</i> I	G C A T G\C C\G T A C G
<i>Fse</i> I	G G C C G G\C C C C\G G C C G G	<i>Xma</i> I	C\C C G G G G G G C C\C

Tab. 2.4: Verwendete Restriktionsenzyme.

2.4.5 Dephosphorylierung

Zur Dephosphorylierung der 5'-DNA-Enden, wurde die DNA-Lösung mit ca. 2 U Calf Intestinal Phosphatase (CIP) (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) pro μ g DNA im entsprechenden Puffer versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgten zwei weitere Zugaben von je 2 U CIP pro μ g DNA, wobei nach jeder Enzymzugabe 30 min bei 37°C inkubiert wurde. Die CIP wurde anschließend durch 15 min Inkubation bei 85°C inaktiviert.

2.4.6 DNA-Fällungen

2.4.6.1 Phenol/Chloroformextraktion und Isopropanolfällung

Zur Extraktion wurde die DNA-Lösung mit dem gleichen Volumen einer Phenol-Chloroform-Mischung (Verhältnis 1 : 1) gemischt und für 2 min zentrifugiert.

Der wässrige Überstand wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen einer Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (Verhältnis 24 : 1) versetzt, gemischt und für 2 min zentrifugiert.

Der wässrige Überstand wurde mit dem gleichen Volumen Ammoniumacetat 4 M (NH₄Ac) versetzt und durch Invertieren gemischt.

Anschließend wurde Isopropanol bis zu einer Endkonzentration von 50 % zugeben und der Ansatz wurde nochmals durch Invertieren gemischt.

Es folgte eine 5 minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurde die DNA durch eine Zentrifugation (40 min, 14000 rpm (Rotor 1412, Hettich, Tuttlingen), 4°C) pelletiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen.

Nach dem Waschschrift wurde das DNA-Pellet luftgetrocknet.

Die Isopropanolfällung wurde nur zur Fällung von DNA-Fragmenten über 100 bp Länge verwendet.

2.4.6.2 Ethanol-Fällung

Im Gegensatz zu einer Fällung durch Isopropanol eignet sich die Ethanol-Fällung besonders für die quantitative Fällung kleiner Fragmente und wurde z.B. zur Aufreinigung der Produkte einer Sequenzierreaktion verwendet.

20 µl DNA-Lösung wurden mit 3 µl Na-Acetat (3 M) versetzt und durch Invertieren gemischt. 50 µl 100 % Ethanol wurden zugeben und der Ansatz wurde nochmals gründlich durch Invertieren gemischt.

Anschließend wurde der Ansatz in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Der gefrorene Ansatz wurde in die Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen) eingestellt und für 30 min bei 4°C, 14000 rpm (Rotor 1412) zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen. Dazu wurde nochmals 10 min bei 4°C mit 14000 rpm (Rotor 1412, Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert.

Nach dem Waschschrift wurde der Überstand möglichst vollständig abgezogen und verworfen. Das Pellet wurde für 10 min unter Erhitzen und Vakuum getrocknet (Vacuum Concentrator, Bachhofer, Reutlingen).

2.4.7 Ligation

Für eine Ligation wurden Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von 1 : 2 eingesetzt. Insgesamt enthielt der Ligationsansatz 10 ng/µl DNA.

10 µl Ligationsansatz:

Vektorlösung, mit ca. 2×10^{-11} mol DNA; Insertlösung, mit ca. 4×10^{-11} mol DNA; 1 µl 10 x Puffer für T4-DNA-Ligase mit 10 mM ATP (NEB, Frankfurt); 0,2-0,5 µl T4-DNA-Ligase (NEB, Frankfurt); mit sterilem, zweifach destilliertem Wasser auf 10 µl auffüllen.

Der Ligationsansatz wurde für 2-4 h bei 16°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.4.8 Transformation

Die Plasmide wurden in Bakterienzellen (*E. coli* JM 101) eingebracht, mit deren Hilfe die DNA vermehrt und die Proteine exprimiert werden konnten. Nur speziell vorbehandelte Bakterienzellen (kompetente Zellen) sind in der Lage, Plasmid-DNA aufzunehmen.

2.4.8.1 Herstellung kompetenter Zellen

Material:

Alle Lösungen wurden für 20 min bei 121°C autoklaviert.

- LB-MgCl₂-Platten: 1 % Bacto-Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 1 % NaCl; 10 mM MgCl₂; pH 7,5 einstellen; 1,5 % Agar zugeben. Nach 20 min bei 121°C Medium auf 50°C abkühlen und in Einmal-Petrischalen gießen.
- TYM-Broth-Medium: 2 % Bacto-Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 0,1 M NaCl; 10 mM MgCl₂; pH 7,5 einstellen.
- Tfb I: 30 mM KOAc; 100 mM KCl; 10 mM CaCl₂; 15 % (w/v) Glycerin; 50 mM MnCl₂
- Tfb II: 75 mM CaCl₂; 10 mM Na-MOPS (pH 7); 10 mM KCl; 15 % (w/v) Glycerin

Durchführung:

E. coli JM101 Zellen wurden auf LB-Platten mit 10 mM MgCl₂ ausstreichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

100 ml TYM BROTH in einem 250 ml Erlenmeyer-Kolben wurden mit einer einzelnen Kolonie beimpft und bei 37°C, 200 rpm inkubiert, bis nach ca. 4-5 h eine OD₅₅₀ von 0,8-0,9 erreicht war.

Die Kultur wurde in Schraubdeckelröhrchen überführt und bei 4°C, 3000 rpm solange zentrifugiert (Rotor JA20, Beckman Instruments GmbH, München), bis die Zellen vollständig sedimentiert waren (10-20 min).

Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Zellen wurden kurz abgetropft.

Die Zellen wurden ab diesem Schritt auf Eis gehalten, in 30-40 ml Tfb I vorsichtig resuspendiert und für weitere 20 min auf Eis inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen bei 4°C, 3000 rpm (Rotor JA20, Beckman Instruments GmbH, München) für 8 min sedimentiert.

Die Zellen wurden in 4 ml TfbII vorsichtig auf Eis resuspendiert.

Jeweils 50 µl der Suspension wurden in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße transferiert und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die kompetenten Zellen wurden bei -80°C gelagert.

2.4.8.2 Transformation kompetenter Zellen

Material:

- LB-Medium: 1 % Bacto Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 1 % NaCl; Mit NaOH pH 7,5 einstellen. Für 20 min bei 121°C autoklavieren.

- LB-Amp-Platten: LB-Medium; 1,5 % Agar; Für 20 min bei 121°C autoklavieren. Nach dem Abkühlen auf 45-50°C 100 µg/ml Ampicillin zugeben und die Lösung in Einmal-Petrischalen verteilen.

Durchführung:

50 µl kompetente Zellen wurden für 15 min auf Eis aufgetaut, mit 5 µl des Ligationsansatzes bzw. mindestens 1 ng DNA versetzt und durch Rühren mit der Pipettenspitze vorsichtig gemischt.

Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 5 min bei 22°C inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 450 µl LB-Medium ohne Ampicillin beendet.

Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert und dabei über Kopf gedreht, um eine Belüftung zu gewährleisten.

Bis zu 200 µl eines Transformationsansatzes wurden auf einer LB-Platte mit Ampicillin ausgestrichen.

2.4.9 Kolonie-Lift

Die Bakterien-Kolonien auf einer LB-Agar-Platte wurden auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen, wo die Expression des Lhcb1-Proteins mithilfe von Antikörpern nachgewiesen werden konnte.

Material:

- Nitrocellulose-Membran: Protran Cellulosenitrat BA85/20, 0,45 µm Porenweite, einzeln steril verpackt, Schleicher & Schuell, Dassel
- Lysispuffer: 0,1 M Tris-HCl (pH 7,7); 0,15 M NaCl; 5 mM MgCl₂; 1,5 % BSA; 1 µg/ml DNase I; 0,04 mg/ml Lysozym. Die Enzyme wurden erst unmittelbar vor der Verwendung zugegeben.
- TNT: 10 mM Tris-HCl (pH 8); 0,15 M NaCl; 0,05 % Tween 20
- Blockierungspuffer: 3 % BSA in TNT
- Antikörper: vgl. Kap. 2.8.4.1

Durchführung:

Die Nitrocellulose-Membran wurde an 3 nicht symmetrischen Positionen markiert und auf die Bakterienplatte aufgelegt. Die Markierungen der Membran wurden auf die Platte übertragen.

Als die Membran vollständig durchfeuchtet war, wurde sie abgezogen und mit den Kolonien nach oben auf eine LB-Agar-Platte gelegt, auf der zuvor 10 ml 100 mM IPTG ausplattiert worden waren.

Die Platte wurde 2-4 h bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde die Membran mit den Kolonien nach oben auf feuchte Papiertücher gelegt. Zusammen mit einer Glas-Petrischale mit Chloroform wurde sie durch ein größeres Gefäß abgedeckt und für 15 min inkubiert.

Danach wurde die Membran in Lysispuffer transferiert und über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Gel-Schüttler inkubiert.

Die Membran wurde 3 x 30 min in TNT gewaschen und anschließend für 30 min in Blockierungspuffer inkubiert (RT).

Anschließend wurde die Membran für 2,5 h mit dem 1. Antikörper (SA7430, 1 : 5000 verdünnt in Blocking-Puffer) inkubiert (RT).

Es folgten drei Waschschrte: 10 min in TNT mit 0,1 % BSA; 10 min in TNT mit 0,1 % BSA und 0,1 % Nonidet P40; 10 min waschen in TNT mit 0,1 % BSA.

Danach wurde für 1 h mit dem 2. Antikörper (Anti-Rabbit-AP, verdünnt in Blocking-Puffer) inkubiert (RT).

Es folgten drei Waschschrte wie oben.

Anschließend wurde die Membran in 5 ml AP-Puffer mit 0,33 mg/ml NBT und BCIP inkubiert, bis die Signale sichtbar waren.

Anhand der Markierungen wurden die Signale den Kolonien auf der Agarplatte zugeordnet.

2.4.10 Plasmid-Präparation

2.4.10.1 Minipräparation (nach He et al., 1990)

Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA aus Bakterienzellen, kann die Plasmid-DNA selektiv durch LiCl gefällt werden. Auf diese Weise wurden kleinere Mengen an Plasmid-DNA gewonnen, die z.B. in einen Restriktionsverdau zur Kontrolle von Schnittstellen eingesetzt wurden.

Material:

- He-Puffer: 2,5 M LiCl; 50 mM Tris-HCl (pH 8); 4 % Triton X-100; 62,5 mM EDTA

Durchführung:

1,5 ml einer *E. coli*-Kultur wurden in ein Eppendorf-Gefäß gefüllt und für 30 sec zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgegossen, der verbleibende Rest wurde mit einer Pipette abgezogen.

Das Bakterienpellet wurde in 100 µl He-Puffer resuspendiert.

100 µl einer Phenol/Chloroform-Mischung (Verhältnis 1 : 1) wurden zugefügt. Der Ansatz wurde für 15 sec kräftig gemischt und anschließend für 2 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert.

Der DNA-haltige Überstand wurde abgezogen, ohne Material aus der weißen Zwischenphase aufzunehmen, und in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben.

200 µl 100 % Ethanol (-20°C) wurden zugefügt, der Ansatz wurde gut gemischt und für 10 min bei 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgegossen, der verbleibende Rest wurde mit einer Pipette abgezogen.

800 µl 70 % Ethanol (-20°C) wurden zugefügt, der Ansatz wurde gut gemischt und für 10 min bei 4°C zentrifugiert (Rotor 1412, Hettich, Tuttlingen).

Überstand wurde abgegossen, der verbleibende Rest wurde aus dem Röhrchen geschüttelt.

800 µl 100 % Ethanol (-20°C) wurden zugefügt und der Ansatz wurde wie oben zentrifugiert.

Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen, das Plasmid-DNA-Pellet wurde für 10 min im Vakuum (Vacuum Concentrator, Bachhofer, Reutlingen) getrocknet und anschließend in 30 µl sterilem, zweifach destilliertem Wasser aufgenommen. Pro Verdau wurden 10 µl der Präparation eingesetzt.

2.4.10.2 Midi-Präparation

Größere Mengen sehr sauberer Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wurden mithilfe des Extraktionskits Nucleobond AX100 (Macherey-Nagel, Düren) gewonnen. Die Extraktion wurde nach beiliegender Vorschrift durchgeführt.

2.4.11 Photometrische DNA-Quantifizierung

Die Konzentration von Plasmid-DNA-Lösungen wurde über ihre Absorption bei 260 nm bestimmt. Für die Umrechnung wurde angenommen, dass eine DNA-Lösung mit einer Konzentration von 50 µg/ml eine Absorption von 1 bei 260 nm hat.

2.4.12 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nach einer modifizierten Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Ausgehend von einem Primermolekül werden dabei mithilfe einer DNA-Polymerase neue DNA-Moleküle synthetisiert. Da neben den Deoxy- auch die Dideoxyformen der Nukleosidtriphosphate (dNTP bzw. ddNTP) im Ansatz vorliegen, die einen Kettenabbruch verursachen, werden unterschiedlich lange Fragmente synthetisiert. Die vier verschiedenen ddNTPs sind jeweils mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert, so dass das jeweils die letzte Base eines DNA-Fragmentes anhand der Fluoreszenz identifiziert werden kann. Da die Bedingungen so gewählt wurden, dass es rein statistisch in jeder Position zu einem Einbau eines fluoreszenzmarkierten ddNTPs kam, konnte die Sequenz, nach einer Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe, anhand der Fluoreszenzen abgelesen werden. Die Auftrennung der Produkte der Sequenzierreaktion sowie die Sequenzanalyse wurden von der Firma Genterprise (Mainz) durchgeführt.

Die Methode der DNA-Sequenzierung wurde im Laufe der Arbeit umgestellt, es sind beide Methoden angegeben.

1. BigDye v.2.0:

Sequenzieransatz: 200-500 ng DNA; 10 pmol Sequenzierprimer; 4 µl BigDye-Premix Version 2.0; mit sterilem, zweifach destilliertem Wasser auf 20 µl auffüllen.

Sequenzier-PCR: 25 Zyklen: 30 sec 96°C; 15 sec 50°C; 4 min 60°C

Nach dem alten Protokoll musste die DNA nach der Sequenzierung durch Ethanol gefällt werden (vgl. Ethanol-Fällung).

2. BigDye v3.1:

Größe der Template-DNA	Einzusetzende Menge
Plasmid-DNA	170-350 ng
PCR-Produkte 1 kB	70 ng
PCR-Produkte 500 bp	35 ng
PCR-Produkte 200 bp	15 ng

Tab. 2.5: Template-Mengen für BigDye v3.1.

Sequenzieransatz: Template-DNA; 10 pmol Sequenzierprimer; 2 µl BigDye-Premix Version 3.1; 2 µl 5 x Puffer für BigDye v3.1; mit sterilem, zweifach destilliertem Wasser auf 10 µl auffüllen.

Sequenzier-PCR: 30 Zyklen: 10 sec 96°C; 4 min 55°C

2.4.13 Oligonukleotid-Annealing

Zur Herstellung eines doppelsträngigen DNA-Fragmentes aus zwei chemisch synthetisierten einzelsträngigen DNA-Molekülen, wurden die komplementären DNA-Stränge gemischt und unter bestimmten Bedingungen inkubiert.

Material:

- Sense- und Antisense-Oligonukleotidlösungen mit einer DNA-Konzentration von 100 pmol/μl.
- 5 x Annealing-Puffer: 200 mM Tris-HCl (pH 7,5); 100 mM MgCl₂; 250 mM NaCl

Durchführung:

4 μl Sense-Oligonukleotid-Lösung (100 pmol/μl); 4 μl Antisense-Oligonukleotid-Lösung (100 pmol/μl) und 2 μl 5 x Annealing-Puffer wurden gemischt und für 10 min auf 100°C erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz über Nacht in einem Wasserbad von 75°C auf Raumtemperatur abgekühlt.

2.4.14 Phosphorylierung

Vor einer Ligation wurde sichergestellt, dass die DNA-Fragmente an ihrem 5'-Ende eine Phosphatgruppe tragen. Falls ein DNA-Fragment aus synthetisierten Oligonukleotiden in eine Ligation eingesetzt werden sollte, wurden die 5'-Enden enzymatisch phosphoryliert.

Phosphorylierungsansatz: 1 μl Annealing-Ansatz mit 40 pmol DNA; 1 μl 10 x T4 Polynukleotidkinase-Puffer (NEB, Frankfurt); 1 μl 10 mM ATP; 6,8 μl H₂O; 0,2 μl T4 Polynukleotidkinase mit 10 U/μl (NEB, Frankfurt)

Der Phosphorylierungsansatz wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 20 min auf 65°C erhitzt, um die Kinase zu inaktivieren. Das phosphorylierte DNA-Fragment wurde vor einer Ligation nicht aufgereinigt.

2.4.15 Mutagenese-PCR

In der vorliegenden Arbeit sind verschiedene Experimente dargestellt, in denen durch eine PCR-Methode zufällige Punktmutationen in bestimmten Abschnitten der Lhcb1-cDNA induziert wurden. Diese Methode basiert auf einer Erhöhung der Fehlerrate der DNA-Polymerase aus *Thermococcus aquaticus* durch Modifikation des PCR-Ansatzes (Cadwell et al., 1995; Vartanian et al., 1996; Shafikhani et al., 1997; Heinemann et al., 1999).

Zur Steigerung der Fehlerrate der *Taq*-DNA-Polymerase wurde dem PCR-Ansatz 0,5 mM MnCl₂ zugesetzt und die dNTPs dCTP/dTTP wurden in fünffach höherer Konzentration eingesetzt als dATP/dGTP. Unter diesen Bedingungen wurden Fehlerraten von 0,49 % (Shafikhani et al., 1997) bis 0,66 % (Cadwell et al., 1995) beobachtet.

Wie sich im Laufe der vorliegenden Arbeit herausstellte, wird die Fehlerrate auch durch die MgCl₂-Konzentration im PCR-Ansatz beeinflusst. MgCl₂ unterstützt dabei evtl. nicht-komplementäre Basen-Paarungen (Cadwell et al., 1995).

Die Fehlerrate der *Taq*-Polymerase steht in einem direkten Zusammenhang zu der MnCl₂-Konzentration im PCR-Ansatz. Konzentrationen über 0,5 mM MnCl₂ führten allerdings zu deutlich reduzierten Erträgen (Leung et al., 1989; Heinemann, 2000). Eine andere Möglichkeit zur Steigerung der Austauschrate ist die Durchführung mehrerer hintereinander geschalteter PCR-Runden, in denen jeweils das Produkt der vorhergehenden PCR als Template in die nachfolgende PCR-Runde eingesetzt wird (Shafikhani et al., 1997; Heinemann et al., 1999).

PCR-Puffer:

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene PCR-Puffer für die Mutagenese-PCR verwendet:

1	2	3	4
---	---	---	---

20 mM Tris-HCl (pH 8,55); 16 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 2 mM MgCl ₂	10 mM Tris-HCl (pH 8,5); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl ₂	10 mM Tris-HCl (pH 8,8 bzw. 8,5); 50 mM KCl; 7 mM MgCl ₂	10 mM Tris-HCl (pH 8,3); 50 mM KCl; 5 mM MgCl ₂
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------

Tab. 2.6 : Verwendete PCR-Puffer.

PCR-Ansatz: 10 µl 10 x PCR-Puffer; 0,5 µl dATP/dGTP (jeweils 50 mM); 2,5 µl dCTP/dTTP (jeweils 50 mM); 0,5 µl Sense-Primer (100 µM); 0,5 µl Antisense-Primer (100 µM); Template-DNA (Endkonzentration 14 fM-0,7 nM, wie angegeben); mit zweifach destilliertem, sterilem Wasser auf 99 µl auffüllen.

Nach 1-5 min bei 95°C wurde zu jedem Ansatz folgendes zugegeben:

0,5 µl MnCl₂ und 2,5 U *Taq*-DNA-Polymerase (peqGOLD *Taq*-DNA-Polymerase, Peqlab, Erlangen).

PCR-Programm:

35 Zyklen: 60 sec 92°C; 60 sec 52°C; 90 sec 72°C. Nach dem letzten Zyklus: 10 min 72°C

2.4.16 Herstellung des Lhcb1-Derivates W97Rhis

Der C-Terminus der Lhcb1-Mutante W97R (zur Herkunft dieser Mutante vgl. Diplomarbeit K. Eggert (2000) bzw. Kap. 3.4.1 dieser Arbeit) wurde durch sechs Histidin-Reste verlängert. Dazu wurde das *Eco*RI-*Bst*EII-Fragment aus C3.2h gegen das aus W97R ausgetauscht.

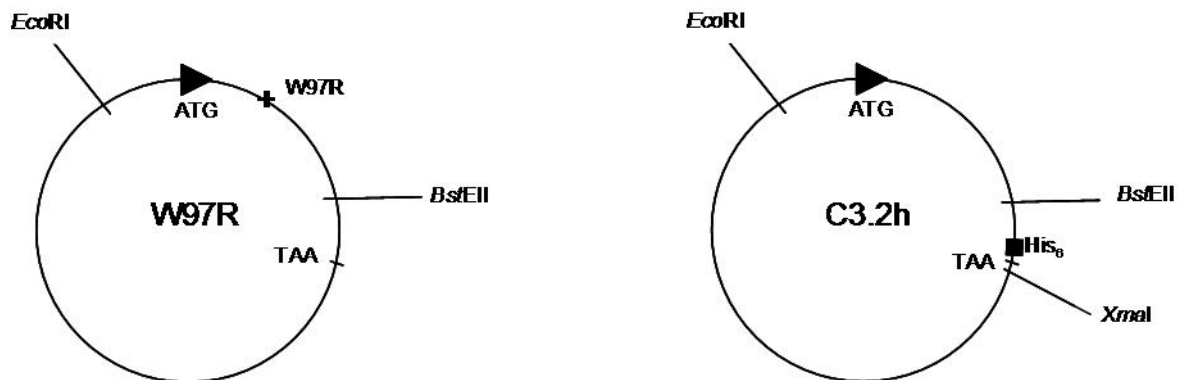


Abb. 2.1: Herstellung von W97Rhis.

2.4.17 Herstellung der Lhcb1-Mutanten I143H, N183D und E207G

Nach den Selektionsexperimenten wurde das Fragment zwischen Primer SphI_VM und T7_His der selektierten Mutanten von T7 GlySerSphI durch eine PCR amplifiziert. Das Fragment wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen *Bst*EII und *Xma*I verdaut und in C3.2h, ebenfalls verdaut und dephosphoryliert, eingesetzt.

T7 GlySerSphI, evtl. mutiert:

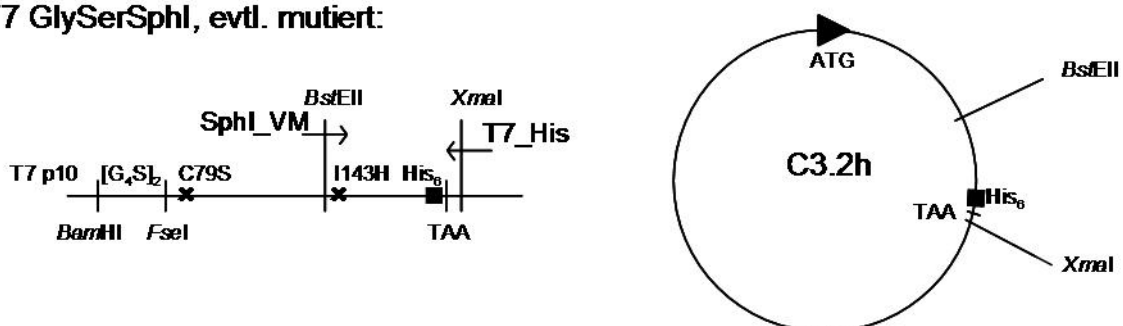


Abb. 2.2: Herstellung der Lhcb1-Mutanten I143H, N183D und E207G.

2.5 Expression von Lhcb1-Proteinen als Phage-Display

T7 ist ein Bakteriophage mit icosahedraler Struktur und einem doppelsträngigen DNA-Genom. Das Peptid oder Protein, das als Phage-Display exprimiert werden soll, wird über seinen N-Terminus an den C-Terminus des Hauptproteins der Phagenhülle, p10, fusioniert. Novagen (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.) hat verschiedenen Phage-Display-Vektoren im Angebot, die sich in der Anzahl der Fusionsproteine pro Phage unterscheiden und deren Eignung von der Länge des zu exprimierenden Polypeptids abhängig ist. Für das Lhcb1 bzw. das pLhcb1 wurde der Vektor T7Select 10-3b verwendet, der einen Einbau von Fremdproteinen einer Länge bis zu 1200 Aminosäuren zulässt.

Das Fremdprotein wird in eine *multiple cloning site* anschließend an Kodon 348 des 10B Proteins ligiert. Da für Fremdproteine ab 50 Aminosäuren die Capside nicht mehr ausschließlich aus Fusionsproteinen aufgebaut werden können, wurde die Ribosomen Bindungsstelle s10 in T7Select10-3b modifiziert, um die Translationsrate des Fusionsproteins zu senken (T7Select Handbuch, Novagen, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.). Das Gen steht weiterhin unter der Kontrolle des natürlichen Promotors $\Phi 10$. Das zum Aufbau der Capside notwendige p10 ohne Fusion wird von den Wirtsbakterien zur Verfügung gestellt. Der verwendete Wirtstamm *E. coli* BLT 5615 enthält ein Plasmid mit einem Ampicillin-Resistenzgen und dem Gen für Protein 10A, dessen Expression durch den *lacUV5* Promotor reguliert wird (T7Select Handbuch, Novagen, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.). Vor einer Infektion mit Bakteriophagen muss die Expression des Gens zunächst durch IPTG-Zugabe induziert werden. Nach Angaben des Herstellers (Novagen, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.) werden durchschnittlich 5 bis 15 Kopien eines Fusionsproteins in ein Capsid eingebaut.

2.5.1 Geeignete Restriktionsschnittstellen

Die Lhcb1-Proteine wurden als Fusion an den C-Terminus des majoren T7-Hüllproteins p10 exprimiert. Bei der Ligation der Lhcb1-cDNA in den Phagenvektor muss daher darauf geachtet werden, dass das Leseraster in der Lhcb1-codierenden Sequenz erhalten bleibt. Die eingefügte Lhcb1-Sequenz bildet den neuen C-Terminus des Fusionsproteins, die Wahl der Restriktionsschnittstelle am 3'-Ende der codierenden Sequenz ist daher unproblematisch.

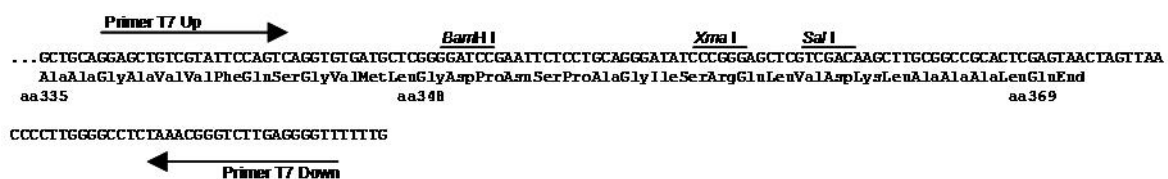


Abb. 2.3: T7Select10-3b cloning site (verändert nach T7Select Handbuch, Novagen, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.).

Die verwendeten Restriktionsschnittstellen, sowie die Bindungsstellen der beiden Primer T7 Up und T7 Down wurden eingezeichnet. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf das codierte Phagenhüllprotein p10.

In allen Konstrukten wurde die Lhcb1-cDNA über eine *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle am N-Terminus in den Phagenvektor kloniert. Als zweite Restriktionsschnittstelle wurde entweder *Xma*I oder *Sal*I verwendet.

2.5.2 Konstrukte

2.5.2.1 T7 1n.1

Zur Expression eines pLhcb1 wurde die *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle am N-Terminus der codierenden Sequenz in 1n.1 so verschoben, dass sie in das Leseraster von T7Select10-3b passt. Das *Bam*HI-*Xma*I-Fragment des resultierenden Produktes wurde in den T7 Vektor ligiert.

Verschiebung der *Bam*HI-Schnittstelle in 1n.1:

	<u><i>Bam</i>HI</u>
1n.1	ATG AGA GGA TCC GCA Met Arg Gly Ser Ala
VM15	<u><i>Bam</i>HI</u>
	ATG AGG GAT CCC GCA Met Thr Asp Pro Ala

Abb. 2.4: N-Termini der pLhcb1-Expressionskonstrukte 1n.1 und VM15

In zwei aufeinander folgenden PCR-Reaktionen, in denen das Amplifikat der ersten Reaktion als Primer in der nachfolgenden PCR-Reaktion diente (Chen et al., 1994), wurde ein Fragment hergestellt, das die veränderte Sequenz eingeschlossen von zwei *Eco*RI-Restriktionsschnittstellen enthielt.

Dazu wurde eine PCR mit dem Antisense-Primer 1n1-Bam HI, der die veränderte Nukleotidsequenz enthielt, und dem Sense-Primer DS23⁺ durchgeführt. Die PCR erfolgte nach dem Standardrezept unter Verwendung der *Pfu*-DNA-Polymerase. Als Template wurde 1n.1 verwendet. Das erwartete Produkt hatte eine Länge von 109 bp.

Das PCR-Produkt wurde durch eine Agarosegelelektrophorese gereinigt, mithilfe des Nucleotrap-Extraktions-Kits aus dem Gel eluiert. 25 % des Eluates wurden als Primer in der zweiten PCR verwendet, wobei der Primer S1 als Gegenprimer verwendet wurde.

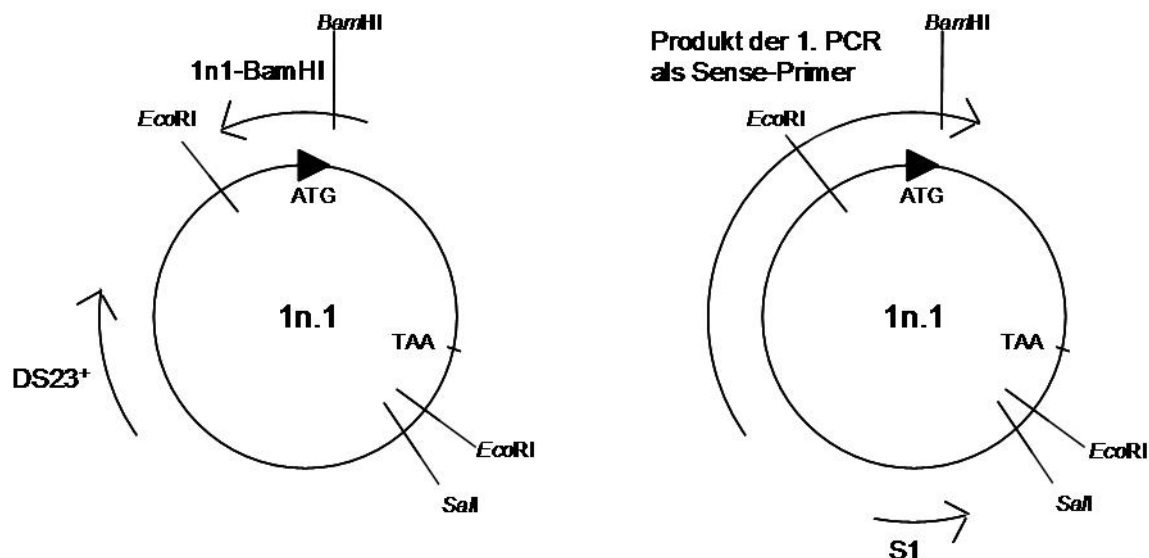


Abb. 2.5: Zur Herstellung von VM15 und T7 1n.1 verwendete Primer und Restriktionsschnittstellen.

Das Produkt der 2. PCR wurde mit *Eco*RI in ebenfalls verdauten und dephosphorylierten 1n.1-Vektor eingesetzt. Nach der Transformation wurde die Lhcb1-Expression mithilfe eines Kolonie-Lifts überprüft und eine Lhcb1-exprimierende Kolonie isoliert. Der Klon wurde mit

VM15 bezeichnet. Das *Bam*HI-*Sal*I-Fragment aus VM15 (938 bp) wurde in den T7 Vektor eingesetzt.

2.5.2.2 T7 1n.1h

Zur Herstellung eines pLhcb1 mit C-terminalem His-Tag, das die T7-kompatible *Bam*HI-Schnittstelle aus VM15 enthält, wurde das *Eco*RI-*Bst*EII-Fragment aus VM15 an die entsprechende Stelle in C3.2h ligiert. C3.2h enthält einen C-terminalen His-Tag und eine *Xma*I-Restriktionsstelle unmittelbar nach dem Stopcodon. Der resultierende Klon wurde mit VM15h bezeichnet. Das *Bam*HI-*Xma*I-Fragment aus VM15h wurde in den T7 Vektor ligiert.

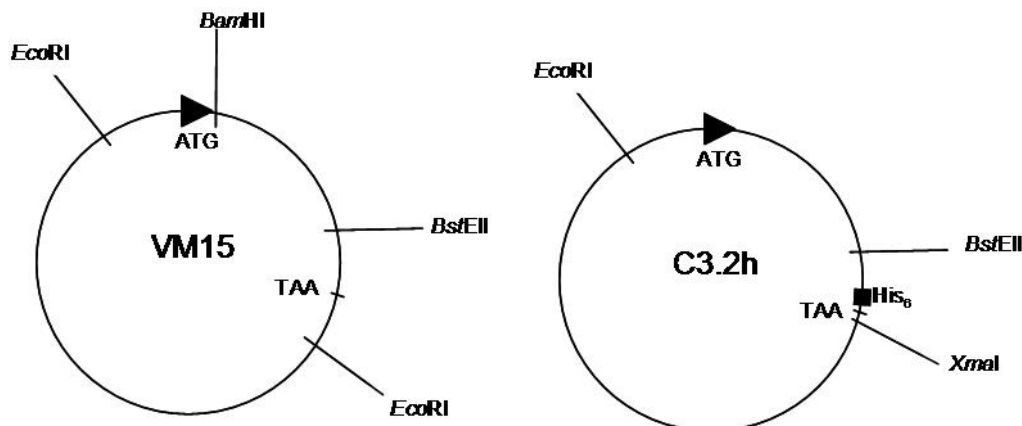


Abb. 2.6: Zur Herstellung von VM15h und T7 1n.1h verwendete Restriktionsschnittstellen in VM15 und C3.2h.

2.5.2.3 T7 D7f.3

Zur Expression eines murenen Lhcb1-Proteins als Phage-Display wurde der N-Terminus von D7f.3 verändert, um eine *Bam*HI-Schnittstelle zu erhalten, die die Ligation in den Phagenvektor erlaubt. Dazu wurde mithilfe des Mutagenese-Primers D7f.3-*Bam*HI und des Gegenprimers LHCP757 ein Fragment mit der gewünschten *Bam*HI-Schnittstelle am N-Terminus hergestellt. Das Fragment wurde mit *Bam*HI und *Bst*EII verdaut und in das Expressionsplasmid VM15h eingesetzt, das einen C-terminalen His-Tag und eine *Xma*I-Schnittstelle enthält. Das *Bam*HI-*Xma*I-Fragment des resultierenden Produktes wurde in den Phagen-Vektor ligiert.

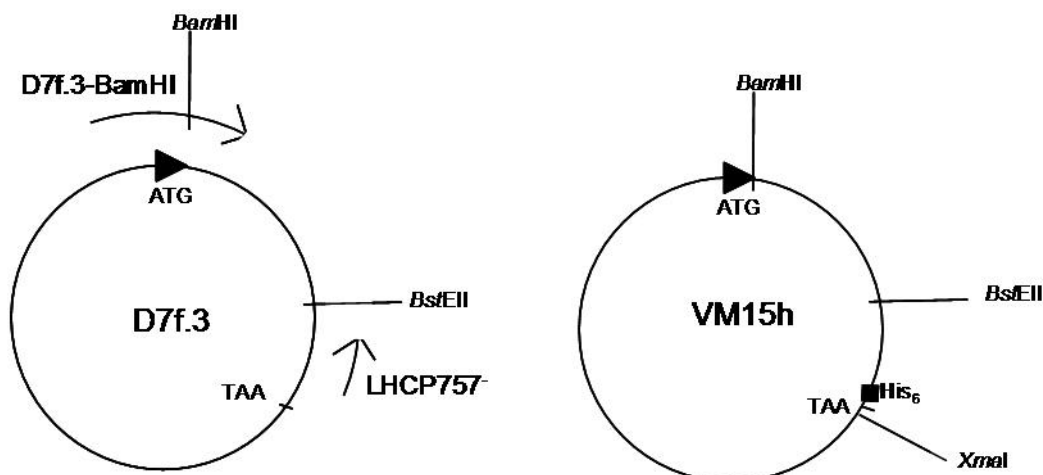


Abb. 2.7: Primer und Restriktionsschnittstellen zur Herstellung von D7f.3-*Bam*HI und T7 D7f.3.

Genau wie der C-Terminus entspricht auch die ATG-Umgebung von D7f.3-BamHI dem pLhcb1Expressionsplasmid VM15h, weist also einige Änderungen im Vergleich zu D7f.3 auf.

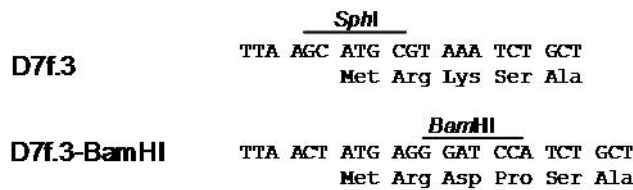


Abb. 2.8: Vergleich der N-Termini von D7f.3 und D7f.3-BamHI.

2.5.2.4 T7 GlySer

Der N-Terminus des murenen Lhcb1-Proteins bis einschließlich T48 wurde durch ein künstliches Fragment aus zwei Wiederholungen der Sequenz G₄S ersetzt. Dazu wurde zunächst das *SacI*-*BstEII*-Fragment aus Sch4, das eine *FseI*-Schnittstelle in der gewünschten Position enthält, in D7f.3-BamHI eingesetzt. In diesem Fragment ist C79 durch ein Serin ausgetauscht. Der resultierende Klon wurde mit D7f3.hBFse bezeichnet.

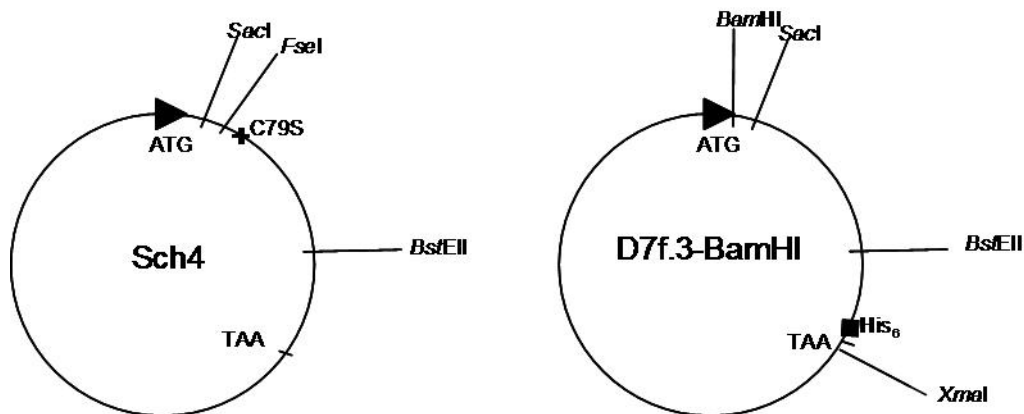


Abb. 2.9: Restriktionsschnittstellen zur Herstellung von D7f3.hBFse.

Das (G₄S)₂-Fragment wurde anstelle des *BamHI*-*FseI*-Fragmentes in Df3hBFse ligiert. Dazu wurden zwei Oligonukleotide synthetisiert (MWG Biotech AG, Ebersberg), deren Annealing-Produkt bereits die einzelsträngigen Überhänge eines *BamHI*-Verdaus am 5'-Ende und eines *FseI*-Verdaus am 3'-Ende enthielt.

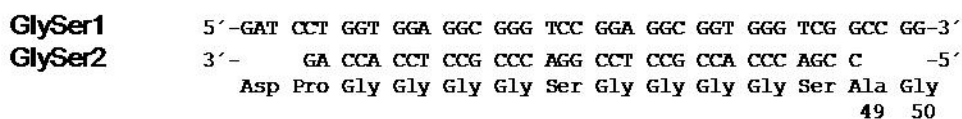


Abb. 2.10: DNA-Fragment aus den Oligonukleotiden GlySer1 und GlySer2 mit resultierender Aminosäuresequenz.

Die Position der letzten zwei Aminosäuren nach Kühlbrandt et al., 1994 ist angegeben.

Nach der Phosphorylierung der 5'-Enden konnte das Fragment direkt in D7f3.hBFse eingesetzt werden. Der resultierende Klon wurde mit GlySer9 bezeichnet.

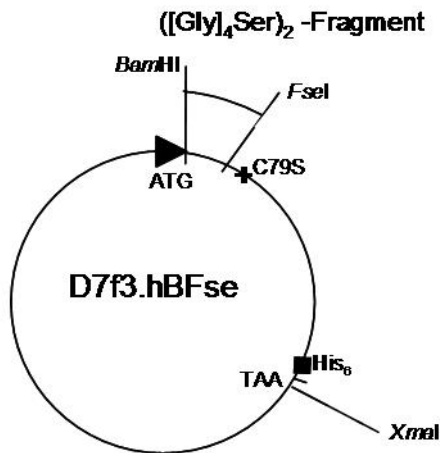


Abb. 2.11: Herstellung von GlySer9.

Das BamHI-XmaI-Fragment aus GlySer9 wurde in den T7-Vektor ligiert.

2.5.2.5 T7 GlySerSphI

Die Zufallsmutagenese (Kap. 3.2.1) sollte auf den C-terminalen Abschnitt des Lhcb1 nach der zweiten Transmembranhelix beschränkt werden. Um dieses Fragment in den T7-Vektor ligieren zu können, war die Einführung einer SphI-Restriktionsschnittstelle am Ende der zweiten Transmembranhelix notwendig. Dabei wurde Isoleucin an der Stelle 143 durch ein Histidin ersetzt.

Zur Einführung der SphI-Restriktionsschnittstelle wurde eine PCR mit dem Mutagenese-Primer SphI_VM und dem Gegenprimer DS178⁻ durchgeführt. Als Template diente GlySer9. Das PCR-Produkt wurde mit BstEII und XmaI verdaut und in das Expressionsplasmid GlySer9 eingesetzt. Der resultierende Klon wurde mit GlySerSphI bezeichnet.

Das BamHI-XmaI-Fragment aus GlySerSphI wurde in den T7 Vektor eingesetzt.

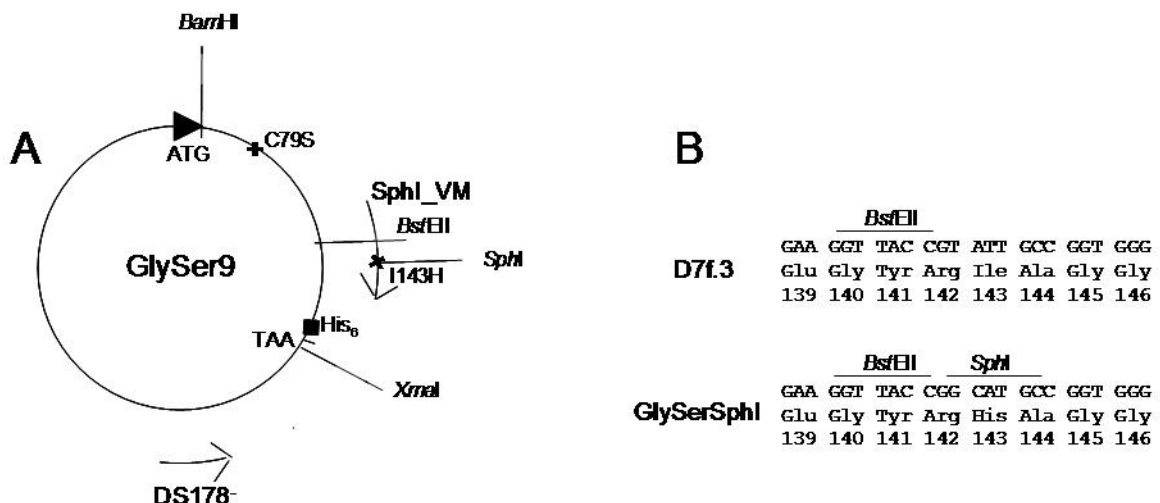


Abb. 2.12: Herstellung von GlySerSphI (A) und SphI-Schnittstelle in GlySerSphI (B). Zählung der Aminosäuren nach Kühlbrandt et al., 1994.

2.5.2.6 T7 Lhcb1-Mutantenbibliothek

Nach der gewünschten Anzahl Mutagenese-PCR-Runden (vgl. Kap. 2.4.15), wobei die jeweils letzte Runde mit dem Primerpaar SphI_VM/XmaI_VM durchgeführt wurde, wurde das

mutierte Fragment mit den Restriktionsenzymen *SphI* und *XmaI* verdaut und in T7 GlySerSphI eingesetzt. Die 5'-Enden des Vektors wurden nach dem Restriktionsverdau dephosphoryliert, um den Hintergrund an religiertem Vektor so gering wie möglich zu halten.

2.5.2.7 T7 ZepLink

Der N-Terminus in Lhcb1 bis einschließlich Y24 wurde durch ein Trypsin-resistentes Fragment einer Länge von 63 Aminosäuren ersetzt. Dieses Fragment entsprach einem Trypsinresistenten Abschnitt der Zeaxanthin-Deepoxidase aus *Chlamydomonas reinhardtii*. Zur Ligation dieses Fragmentes in ein Lhcb1-Plasmid wurde es zunächst mit PCR-Primern amplifiziert, die eine *BamHI*- bzw. eine *FseI*-Schnittstelle enthielten.

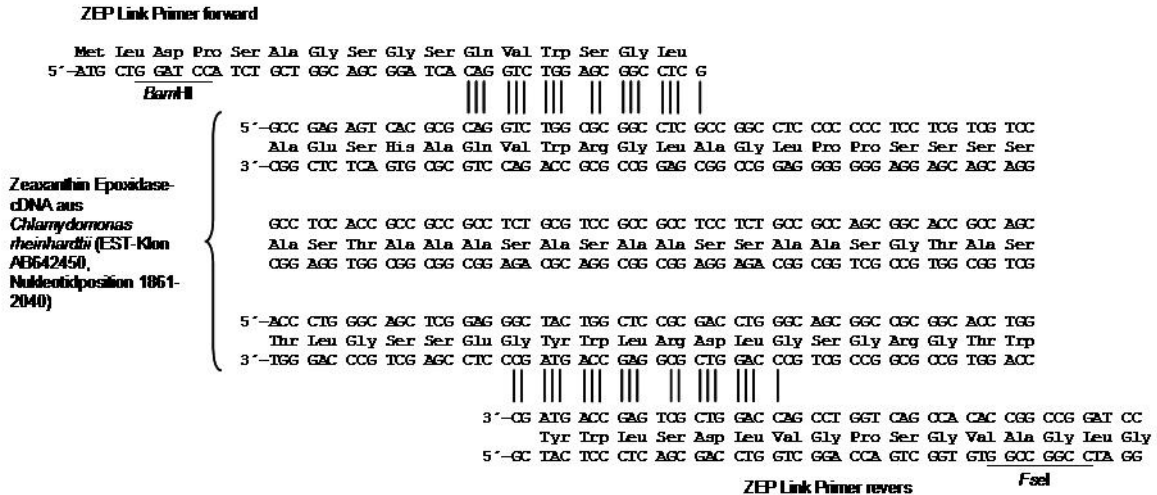


Abb. 2.13: Herstellung des ZEP-Linkers durch eine PCR.

Das ZEP-Link-Fragment wurde von Dr. M. Lohr hergestellt und zur Verfügung gestellt. Template: EST-Klon AV642450 (Kazusa DNA Research Institute, <http://www.kazusa.or.jp/>), einkloniert in Vektor pBluescript II SK-. PCR-Bedingungen: nach Anleitung des Expand Long Template PCR Systems (Roche Applied Science, Mannheim). PCR-Programm: 2 min 94°C; 35 Zyklen: 25 sec 94°C; 30 sec 58°C; 1 min 68°C. Nach dem letzten Zyklus 5 min 68°C. Das Fragment wurde aufgereinigt und in das pGEM®-T Easy Vector System I (Promega, Mannheim) einkloniert.

Neben den passenden *BamHI*- und *FseI*-Restriktionsschnittstellen sollte das modifizierte Lhcb1-Gen auch die *SphI*-Schnittstelle aus GlySerSphI enthalten. Dazu wurde zunächst das *BstEII-XmaI*-Fragment aus GlySerSphI in D7f.3-*BamHI* eingesetzt. Der resultierende Klon wurde mit D7f3BamHISphI bezeichnet.

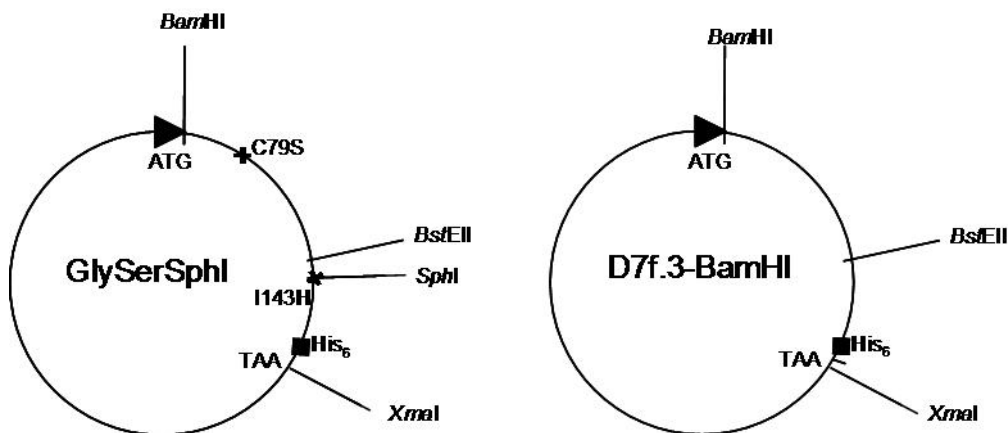
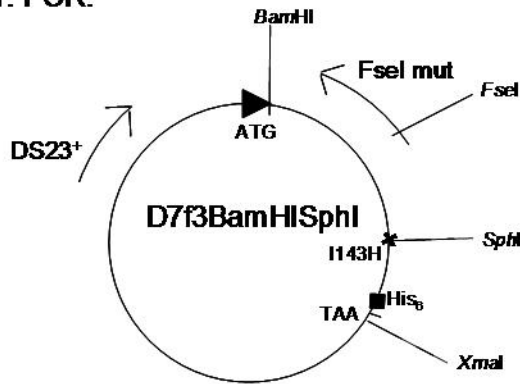


Abb. 2.14: Herstellung von D7f3BamHISphI.

In D7f3BamHISphI wurde eine *FseI*-Schnittstelle an der gewünschten Position generiert. Dazu wurde mithilfe eines Mutagenese-Primers (*FseI* mut) in Antisense-Richtung und

mithilfe des Sequenzierprimers DS23⁺ ein Fragment amplifiziert, das die gewünschte *FseI*-Schnittstelle und die T7 Vektor-verträgliche *Bam*HI-Schnittstelle am 5'-Ende enthielt. Dieses PCR-Produkt von 189 bp Länge wurde in einer nachfolgenden PCR als Sense-Primer eingesetzt.

1. PCR:



2. PCR:

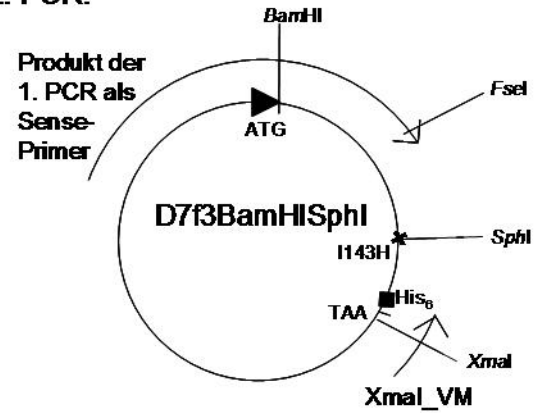


Abb. 2.15: Herstellung des *Bam*HI-*Xma*I-Fragmentes für D7f.3BSF durch zwei aufeinander folgende PCR-Reaktionen.

Das 842 bp lange Produkt der 2. PCR wurde mithilfe der Primer DS23⁺ und *Xma*I_VM nochmals amplifiziert, anschließend gereinigt und mit *Bam*HI und *Xma*I verdaut. Das verdaute PCR-Produkt wurde in D7f3BamHISphI ligiert. Der resultierende Klon wurde mit D7f3BSF bezeichnet.

	17	20		25		30														
	Tyr	Gly	Pro	Asp	Arg	Val	Ala	Gly	Leu	Gly	Pro	Phe	Ser	Gly						
D7f3BSF	5'	-TAC	GGA	CCA	GAC	CGT	<u>GTG</u>	GCC	GGC	CTT	GGC	CCA	TTC	TCC	GGT-3'					
							<i>FseI</i>													
D7f3	5'	-TAC	GGA	CCA	GAC	CGT	GTT	AAG	TAC	TTA	GGC	CCA	TTC	TCC	GGT-3'					
							Tyr	Gly	Pro	Asp	Arg	Val	Lys	Tyr	Leu	Gly	Pro	Phe	Ser	Gly

Abb. 2.16: *FseI*-Schnittstelle in D7f3BSF.

Die Sequenzierung ergab den Verlust eines Nukleotids in der *Bst*EII-Erkennungssequenz, der eine Leserasterverschiebung ab E139 zur Folge hatte. Dieser Verlust ereignete sich vermutlich bei der Herstellung von D7f3BamHISphI, der ebenfalls nicht mehr durch *Bst*EII geschnitten werden konnte.

Die *Bst*EII-Schnittstelle wurde durch eine gerichtete PCR-Mutagenese wieder hergestellt. Dazu wurde mithilfe eines Antisense-Primers, der die *Bst*EII-Schnittstelle enthielt und mithilfe des Sequenzierprimers DS23⁺ das entsprechende Fragment aus D7f3BSF amplifiziert. Nach Verdau mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Bst*EII wurde das Fragment in GlySerSphI eingesetzt.

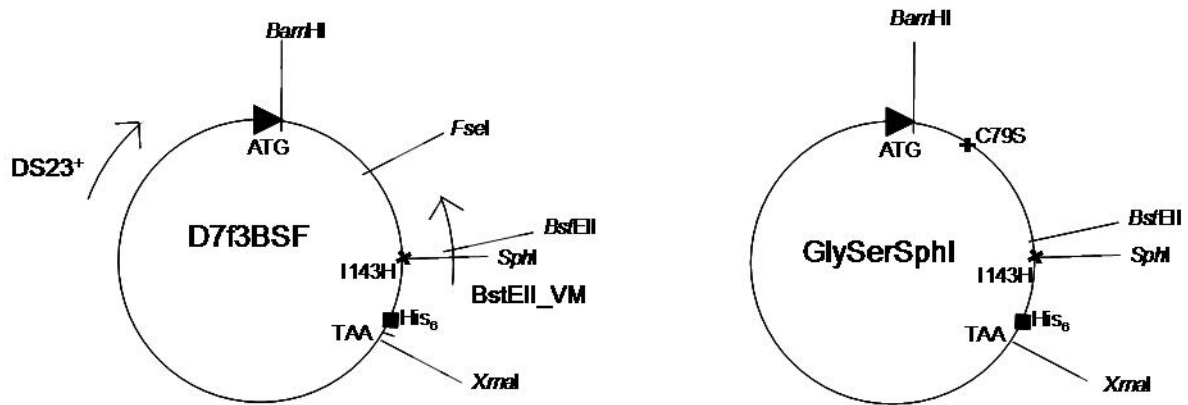


Abb. 2.17: Wiederherstellung der *BstEII*-Schnittstelle D7f3BSF.

Der resultierende Klon wurde mit ZEP Link-Vektor bezeichnet. Nach Verdau mit *Bam*HI und *Fse*I konnte das ZEP Link-Fragment in den ZEP Link-Vektor eingesetzt werden.

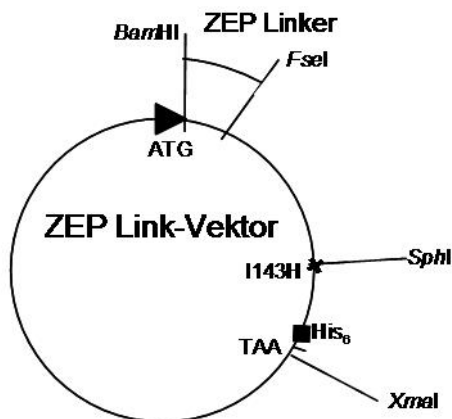


Abb. 2.18: Herstellung von ZEP Link Lhcb1.

Das *Bam*HI-*Xma*I-Fragment aus dem so hergestellten Klon „ZEP Link Lhcb1“ wurde in den T7 Select-Vektor eingesetzt.

2.5.3 Allgemeine Lösungen und Medien

LB-Medium: 10 g/l Bacto Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl. Für 20 min bei 120°C autoklavieren.

LB-Carbenicillin-Medium: LB-Medium nach dem Autoklavieren und Abkühlen mit 50 µg/ml Carbenicillin versetzen.

LB-Carbenicillin-Agarplatten: LB-Medium mit 15 g/l Agar. Für 20 min bei 120°C autoklavieren, abkühlen auf ca. 50°C, 50 µg/ml Carbenicillin zugeben, und in Petrischalen gießen.

M9LB: LB-Medium mit: 1 g/l NH₄Cl; 15 g/l KH₂PO₄; 30 g/l Na₂HPO₄ • 7 H₂O; 20 mM Glucose; 1 mM MgSO₄

Topagarose: 1 % Bacto Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 0,5 % NaCl; 0,6 % Agarose. Für 20 min bei 120°C autoklavieren. Vor Gebrauch durch Erhitzen verflüssigen und auf 50°C temperieren.

2.5.4 Amplifizierung der Bakteriophagen in Flüssigkultur

Die exprimierten Fremdproteine auf der Phagenoberfläche sind sehr empfindlich gegenüber proteolytischem Abbau und daher nicht auf unbegrenzte Zeit stabil. Für den Nachweis des Fusionsproteins und die Selektionsexperimente wurden ausschließlich frisch amplifizierte Bakteriophagen verwendet.

2.5.4.1 Volumina bis 200 ml

Eine Übernacht-Kultur von *E. coli* BLT5615 in LB-Carbenicillin wurde um Faktor 4 mit M9LB-Carbenicillin-Medium verdünnt, mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) versetzt und mit Plaque-Material infiziert. Dazu wurde ein einzelner Plaque mit einer sterilen, gestopften Pasteurpipette ausgestochen und in die Kultur transferiert.

Die Kultur wurde bei 37°C geschüttelt (190 rpm) bis die Lyse erfolgte (1 h 40 min).

Nach der Lyse wurde die Kultur mit 0,5 M NaCl (Endkonzentration) versetzt und durch Schwenken gemischt.

Die Bakterienreste wurden durch eine Zentrifugation (10 min, 4°C, 8000 rpm, Rotor JLA10500, Beckman Instruments GmbH, München) pelletiert. Das geklärte Lysat (Überstand) wurde nach diesem Schritt entweder für die Infektion neuer Kulturen bei 4°C aufbewahrt oder direkt weiter verarbeitet.

Die Bakteriophagen wurden durch die Zugabe von 10 % PEG 8000 (Endkonzentration) pelletiert. Das PEG (1/5 Volumen 50 % PEG 8000 in H₂O) wurde unter Rühren zu dem Überstand geben. Es wurde bei Raumtemperatur gerührt, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren.

Die Mischung wurde für 30 min auf Eis inkubiert.

Anschließend wurden die Bakteriophagen durch eine Zentrifugation (10 min, 4°C, 8000 rpm Rotor JLA10500, Beckman Instruments GmbH, München) pelletiert.

Der Überstand wurde verworfen, das Pellet, das über den gesamten Wandbereich des Zentrifugenbeckers verteilt war, wurde abgetropft, der Innenrand des Zentrifugenbeckers wurde ausgewischt.

Das Pellet wurde anschließend in dem jeweiligen Puffer resuspendiert.

Die Bakteriophagen wurden für die meisten Experimente weiter aufgereinigt (Kap. 2.5.6).

2.5.4.2 Volumina ab 200 ml

Eine Übernacht-Kultur von *E. coli* BLT5615 wurde um Faktor 100 mit M9LB-Carbenicillin-Medium verdünnt und für 1,5 h bei 37°C geschüttelt (190 rpm).

Anschließend wurde 1 mM IPTG (Endkonzentration) zugeben und für weitere 30 min bei 37°C geschüttelt.

Danach erfolgte die Infektion der BLT5615-Kultur mit Plaque-Material, wie oben beschrieben.

Die Kultur wurde weiter bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis die Lyse erfolgte (1-1,5 h).

Die freigesetzte bakterielle DNA wurde durch Zugabe von 0,2 µg/ml DNaseI (Endkonzentration) und 15 min Inkubation bei 37°C verdaut.

Es wurde 1 M NaCl (Endkonzentration) zugeben.

Anschließend wurden die Bakterienreste durch eine Zentrifugation abgetrennt (10 min, 4°C, 7000 rpm, Rotor JLA10500, Beckman Instruments GmbH, München).

Der Überstand wurde unter Rühren mit festem PEG 8000 bis zu einer Endkonzentration von 10 % versetzt.

Die Lysate wurden bei Raumtemperatur gerührt, bis das PEG vollständig gelöst war und anschließend für 30 min bei 4°C inkubiert.

Die Bakteriophagen wurden durch eine Zentrifugation (10 min, 4°C, 8000 rpm, Rotor JLA10500, Beckman Instruments GmbH, München) pelletiert.

Die Bakteriophagenpellets wurden abgetropft und der Innenrand der Zentrifugenbecher wurde trocken gewischt.

Die Bakteriophagen wurden in 1/100 Kulturvolumen 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) resuspendiert und, wie in Kap. 2.5.6 beschrieben, weiter aufgereinigt.

2.5.5 Dauerkulturen

Nach der Zugabe von NaCl und der anschließenden Zentrifugation wurden die Lysate mit 1/10 Volumen 80 % Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert.

Für den ständigen Gebrauch wurden die geklärten Lysate bei 4°C gelagert.

2.5.6 Reinigung und Konzentrierung der Bakteriophagen

Je nach Anwendung waren verschiedene Reinheitsstufen und verschiedene Konzentrationen der Bakteriophagen notwendig. Im Folgenden sind verschiedene Reinigungsschritte dargestellt, die je nach Bedarf durchgeführt wurden.

Nach Amplifizierung der Bakteriophagen in Flüssigkultur ist mit einem Phagentiter von 10^{10} pfu/ml zu rechnen. Auf eine Klärung des Lysates durch Pelletierung der Bakterienreste sollte nicht verzichtet werden, da es andernfalls zu einer raschen Abnahme des Phagentiters kommen kann. Die Zugabe von NaCl ist dazu nicht unbedingt erforderlich, wurde jedoch in den meisten Fällen beibehalten.

Durch die bereits beschriebene PEG-Fällung wurde eine erste Konzentrierung der Bakteriophagen erreicht. Die resuspendierten Bakteriophagen sind jedoch sehr stark verschmutzt und sollten vor einer weiteren Verwendung unbedingt gereinigt werden.

2.5.6.1 Chloroform-Extraktion

Nach Resuspendierung der PEG-Bakteriophagen-Pellets wurde die Suspension in 50 ml Schraubdeckelzentrifugenröhrchen überführt und mit dem gleichen Volumen Chloroform für 30 sec kräftig gemischt.

Durch eine anschließende Zentrifugation (15 min, 4°C, 5000 rpm, Rotor JA20, Beckman Instruments GmbH, München) wurde eine Phasentrennung erreicht. Dabei enthielt die obere, wässrige Phase die Bakteriophagen.

2.5.6.2 Filtration

Nach einer Chloroform-Extraktion wurden die Bakteriophagen zum Teil mithilfe einer Filtration durch eine Porenweite von 0,2 µm weiter aufgereinigt. Die Bakteriophagen finden sich dabei im Filtrat, während Bakterienreste den Filter nicht passieren.

Bei starker Verschmutzung wurde zunächst durch eine Porenweite von 0,45 µm und anschließend durch 0,2 µm Porenweite filtriert.

2.5.6.3 Zentrifugation durch einen Glycerin-Stufengradienten

Zur Konzentrierung wurden die Bakteriophagen durch eine Ultrazentrifugation pelletiert. Dabei erfolgt eine weitere Reinigung durch Verwendung eines Glycerin-Stufengradienten.

Material:

- Glycerin-Stufengradient: 3 ml 40 % Glycerin in 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) mit 4 ml 5 % Glycerin im gleichen Puffer überschichten.

Durchführung:

5 ml Filtrat wurden auf den Glycerin-Stufengradienten aufgetragen.

Die Gradienten wurden für 1 h, 4°C, 35000 rpm (Rotor SW41 Ti, Beckman Instruments GmbH, München) zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen.

Das Bakteriophagenpellet wurde in einem geeigneten Puffer durch kräftiges Mischen mithilfe eines Mischgerätes und durch Auf- und Abziehen in der Pipettenspitze resuspendiert.

2.5.7 Herstellung der T7 DNA-Vektor-Arme

2.5.7.1 Präparation der T7 Vektor-DNA

Die Bakteriophagen aus 500 ml Lysat wurden nach der PEG-Fällung (vgl. Kap. 2.5.4.2) in 10 ml 10 % PEG; 10 mM Tris-HCl (pH 8); 1mM EDTA resuspendiert und erneut für 10 min bei 7000 rpm, 4°C (Rotor JA20, Beckman Instruments GmbH, München) zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 2,5 ml 1 M NaCl; 10 mM Tris-HCl (pH8); 1 mM EDTA resuspendiert.

Nach einer Zentrifugation wie oben wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Das Pellet wurde nochmal mit 2,5 ml 1 M NaCl; 10 mM Tris-HCl (pH8); 1 mM EDTA extrahiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation mit dem ersten Überstand vereinigt.

Die Lösung wurde ein weiteres Mal für 10 min bei 7000 rpm, 4°C (Rotor JA20, Beckman Instruments GmbH, München) zentrifugiert.

Die Phagen-Lösung wurde für 1 h bei Raumtemperatur gegen das 100fache Volumen an 0,1 M NaCl; 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) dialysiert. Dabei wurde der Puffer viermal ausgetauscht.

Die Lösung wurde in ein Schraubdeckelzentrifugenröhrchen überführt und mit 1 Volumen Phenol extrahiert. Nach Zugabe des Phenols und Mischen wurde für 10 min bei 5000 rpm (Rotor JA20, Beckman Instruments GmbH, München) zentrifugiert.

Die obere, wässrige Phase wurde noch zweimal mit Phenol extrahiert.

Nach der zweiten Phenolextraktion wurde die obere Phase mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1) versetzt, gut gemischt und wie oben zentrifugiert.

Die obere, wässrige Phase wurde noch zweimal mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert.

Der DNA-Gehalt der Lösung wurde durch eine photometrische Messung bestimmt.

Es folgte eine Reinigung der DNA unter Verwendung der Nucleobond AX100-Säulen (Macherey-Nagel, Düren) sowie dazugehöriger Lösungen.

Die DNA-Lösung zum Auftrag auf die Säule wurde folgendermaßen hergestellt: 240 µg DNA, 6 ml S3 (2,8 M Kalium-Acetat, pH 5,1), 180 µl 5 M NaCl, mit sterilem zweifach destilliertem Wasser auffüllen auf 18 ml.

Eine Nucleobond AX100-Säule wurde mit 3 ml L2 (0,1 M Tris-H₃PO₄ (pH 6,3); 15 % Ethanol, 0,9 M KCl) äquilibriert.

4,5 ml der DNA-Lösung wurden auftragen.

Die Säule wurde 2 x mit je 3 ml L3 (0,1 M Tris-H₃PO₄ (pH 6,3); 15 % Ethanol; 1 M KCl) gewaschen.

Die DNA wurde mit 2,5 ml L5 (0,1 M Tris-H₃PO₄ (pH 8,5); 15 % Ethanol; 1 M KCl) eluiert.

Mit der restlichen DNA-Lösung wurde genauso verfahren, wobei die Eluat immer in frischen Röhrchen aufgefangen wurden.

Die Eluate wurde mit dem 2 ml Isopropanol versetzt, gemischt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden die Ansätze für 30 min bei 4°C, 10000 rpm (Rotor JA20, Beckman Instruments GmbH, München) zentrifugiert. Es erschienen kleine weiße Pellets. Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen.

Die DNA-Pellets wurde mit 5 ml 70 % Ethanol versetzt und für 10 min, 4°C, 10000 rpm (Rotor JA20, Beckman Instruments GmbH, München) zentrifugiert.

Die gewaschenen DNA-Pellets wurden bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in insgesamt 30 µl sterilem, zweifach destilliertem Wasser vereinigt. Die Ausbeute lag nach einer Quantifizierung durch Vergleich mit einer Lösung bekannter Konzentration bei ca. 0,45 µg/µl.

2.5.7.2 Verdau mit Restriktionsenzymen

Die T7 Select-DNA wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und dephosphoryliert. Nach der Dephosphorylierung wurde die DNA mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die Trennung der beiden Vektorarme durch eine Agarosegelelektrophorese ist möglich, wurde jedoch nur zu analytischen Zwecken durchgeführt. Eine weitere Aufreinigung oder Trennung der Vektorarme fand nicht statt.

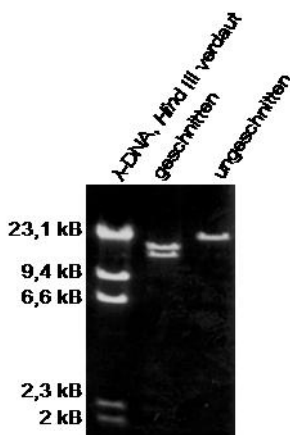


Abb. 2.19: Vektorarme.

50 ng ungeschnittene Vektor-DNA und insgesamt 100 ng der verdauten Vektor-DNA wurden auf ein 0,6 % Agarose-Gel aufgetragen. Zur Auftrennung wurde für 2 h 40 min eine Spannung von 40 V angelegt. Als Längenkontrolle wurde *Hind* II-verdaute λ-DNA aufgetragen, die Längen der Fragmente sind angegeben.

2.5.8 Ligation

Ligationsansatz: 0,5 µg Vektorarme (0,02 pmol); 0,02-0,06 pmol Insert; 0,5 µl 10 x Ligase-Puffer mit 10 mM ATP (NEB, Frankfurt); 80 U T4 DNA-Ligase; mit sterilem, zweifach destilliertem Wasser auf 5 µl auffüllen.

Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert.

2.5.9 *In vitro*-Packaging

5 µl T7 Select Packaging Extract (Novagen, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.) wurde für 15 min auf Eis aufgetaut.

1 µl Ligationsansatz wurde zugegeben.

Der Ansatz wurde für 2 h bei 22°C inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 54 µl LB-Medium beendet.

Zur längerfristigen Lagerung wurden 4 µl Chloroform zugegeben.

Die Ausbeute lag im Allgemeinen bei 5×10^3 bis 10^4 pfu (Plaques forming units, zur Titerbestimmung vgl. Kap. 2.5.10) und damit deutlich unter den Angaben des Herstellers (Novagen, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.) von 5×10^5 bis 10^7 pfu.

2.5.10 Plaque-Assay zur Bestimmung des Phagentiters

Mit Hilfe eines Plaque-Assays wurde der Phagen-Titer einer Probe bestimmt. Dazu wurden Wirtszellen und Bakteriophagen gemischt und zusammen mit flüssiger Agarose auf eine Agarplatte gegossen. Während einer anschließenden Inkubation bildete sich ein Bakterienrasen, in dem die einzelnen Phagen „Löcher“, sogenannte *Plaques*, verursachen. Die Plaques wurden gezählt und der Phagen-Titer wurde in *Plaque forming units (pfu)* angegeben.

Material:

- Über-Nacht-Kultur von *E. coli* BLT 561
- vorgewärmte (37°C) LB-Carbenicillin-Agarplatten
- steriles LB-Medium
- sterile Reagenzgläser
- geschmolzene Topagarose (45 bis 50°C)
- 1 M IPTG

Durchführung:

Zunächst wurden verschiedene Verdünnungen der zu prüfenden Phagen-Probe hergestellt:

Verdünnung um Faktor 10^{-2} → 10 µl Probe + 990 µl LB-Medium

Verdünnung um Faktor 10^{-3} → 100 µl der 10^{-2} -Verdünnung + 900 µl LB-Medium

Verdünnung um Faktor 10^{-4} → 100 µl der 10^{-3} -Verdünnung + 900 µl LB-Medium

etc.

Die Anzahl der notwendigen Verdünnungsstufen richtete sich nach der Art der Probe und dem vermuteten Phagen-Titer. Ziel der Verdünnung war ein Phagentiter von 103 pfu/ml. Die folgenden Werte wurden als Richtlinien herangezogen:

Herkunft der Probe	vermuteter Titer (pfu/ml)	empfohlener Verdünnungsbereich
Eluat nach Affinitätsaufreinigung	10^3 bis 10^6	10^{-2} bis 10^{-5}
Verpackungsreaktion	10^7 bis 10^9	10^{-4} bis 10^{-7}
Lysat	10^{10} bis 10^{11}	10^{-7} bis 10^{-10}

Tab. 2.7: Verdünnungsstufen für Plaque-Assay (nach T7 Select Handbuch, Novagen, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.)

Jeweils 250 µl der Wirtszellkultur und 100 µl einer Phagen-Verdünnung wurden in den sterilen Reagenzgläsern vereinigt.

Die Mischung wurde mit 12 µl 1 M IPTG versetzt.

Möglichst schnell wurden 3 ml geschmolzene Topagarose (45 bis 50°C) zugegeben und vorsichtig gemischt.

Die Mischung wurde auf die vorgewärmte Agarplatte ausgegossen und durch vorsichtiges Schwenken der Agarplatte gleichmäßig verteilt.

Nach Erhärten der Agarose wurde die Platte umgedreht und bei 37°C oder bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Plaques bildeten sich nach 2 bis 4 h bei 37°C bzw. über Nacht bei Raumtemperatur.

Falls die Bakteriophagenplatten für ein Plaque-Lift (siehe Kap. 2.5.11) verwendet werden sollten, wurden die Platten bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert.

Aus der Anzahl der Plaques in einem Plaque-Assay wurde der Phagen-Titer in pfu/ml folgendermaßen bestimmt: Anzahl der Plaques \times 10 \times Verdünnungsfaktor = pfu/ml

2.5.11 Plaque-Lift

Die Plaques in einem Bakterienrasen konnten direkt auf die Expression des Fremdproteins untersucht werden. Dazu wurde Bakteriophagenmaterial aus den Plaques auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und einer immunochemischen Analyse unterzogen.

Ca. 100-500 Bakteriophagen wurden wie oben beschrieben auf einem Bakterienrasen ausplattiert. Zum Entwickeln der Plaques wurde die Platte über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Vor der Durchführung des Plaque-Lifts wurde die Platte für 1 h bei 4°C gekühlt.

Die Nitrocellulosemembran wurde an drei nicht symmetrischen Stellen markiert und anschließend vorsichtig auf die Agaroberfläche gelegt. Die Markierungen der Membran wurden auf die Phagenplatte übertragen, um eine Zuordnung der Signale und der Plaques zu gewährleisten. Nach ca. 1 min Inkubation wurde die Membran vorsichtig abgezogen und für 10 bis 20 min luftgetrocknet.

Die folgenden Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten alle bei Raumtemperatur auf einem Schüttelgerät.

3 x 5 min waschen in TBST (10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 0,5 M NaCl; 0,025 % Tween 20).

30 min in 5 % BSA in TBST inkubieren.

2 h Inkubation mit dem 1. Antikörper (2. Serum SA7430, Anti-Lhcb1 aus Kaninchen vgl. 2.8.4.1; 1 : 5000 verdünnt in TBST).

3 x 5 min waschen in TBST.

1 h Inkubation mit dem 2. Antikörper (Anti-Kaninchen aus Schaf vgl. 2.8.4.1; 1 : 5000 verdünnt in TBST).

3 x 5 min waschen in TBST.

Inkubation mit frisch hergestellter Substratlösung: 50 mM NaCl; 2,5 mM MgCl₂; 50 mM Tris-HCl (pH 9,5); 330 µg/ml NBT; 165 µg/ml BCIP

2.5.12 PCR mit Plaque-Material

Mithilfe einer sterilen Impföse wurde eine kleine Portion Top-Agarose eines Plaques entnommen und in 100 µl 10 mM EDTA pH 8,0 resuspendiert.

Nach Mischen, wurde die Suspension für 10 min auf 65°C erhitzt. Anschließend wurde die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt und für 3 min bei 14000 x g zentrifugiert.

PCR-Ansatz:

1-2 µl Phagen Lysat; 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 25 mM dNTP; 0,1 µM pro Primer.

Nach 5 min Erhitzen auf 80°C 5 mU/µl *Taq*-DNA-Polymerase (peqlab, Erlangen) zugegeben.

PCR-Programm:

Nach der Zugabe der DNA-Polymerase folgten 35 Zyklen: 50 sec Denaturierung bei 94°C, Annealing der Primer für 1 min bei 50°C, 1 min Elongation bei 72°C. Nach dem letzten Zyklus wurde die Temperatur für 6 min bei 72°C belassen.

2.5.13 Sequenzierung

Vor einer Sequenzierung des Phagenvektors wurde das entsprechende DNA-Fragment durch eine PCR amplifiziert und durch eine Gelelektrophorese aufgereinigt. Zum weiteren Vorgehen siehe 2.4.12.

2.6 Standard-Expression von *Lhcb1*-Proteinen

Die Expression von *Lhcb1*-Proteinen wurde in *E. coli* JM101 durchgeführt, die mit den Genkonstruktem im Expressions-Plasmid pDS 12 RBSII-2, wie in Kap. 2.4.8.2 beschrieben, transformiert wurden. Durch IPTG-Zugabe wurde die Expression des *Lhcb1*-Gens induziert und es kam zur Produktion großer Mengen des *Lhcb1*-Proteins. *Lhcb1*-Proteine bilden aufgrund ihres hydrophoben Charakters in den Bakterienzellen größere Proteinaggregate. Diese Einschlusskörper (oder „Inclusion-bodies“) können nach Aufbrechen der Bakterienzellen durch Zentrifugation und Waschen mit milden Detergenzien isoliert werden.

2.6.1 400 ml Kulturvolumen

Material:

- LB-Amp: 1 % Bacto Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 1 % NaCl; pH 7,5; 100 µg/ml Ampicillin
- Lysispuffer: 48 mg DTT; 220 mg DNaseI; 60 ml H₂O
- Detergenspuffer: 200 mM NaCl; 1 % Desoxycholsäure; 1 % Triton-X-100; 20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 2 mM EDTA; 10 mM β-Mercaptoethanol
- Tritonpuffer: 0,5 % Triton-X-100; 1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 10 mM β-Mercaptoethanol
- Tris-Puffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8); 1 mM EDTA; 10 mM β-Mercaptoethanol

Durchführung:

50 ml LB-Amp-Medium wurden mit einer Kolonie des gewünschten Klons angeimpft und über Nacht bei 37°C (Schüttler, 150 rpm) inkubiert.

Diese Vorkultur wurde am nächsten Tag in 400 ml frisches LB-Amp-Medium in einem 2 l-Erlenmeyerkolben überführt und für 1 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

Die Lhcb1-Expression wurde durch Zugabe von 500 µl 1 M IPTG induziert und die Bakterien wurden für weitere 4,5 h bei 37°C inkubiert.

Durch 5 min Zentrifugation bei 7000 rpm (4°C, JLA10500, Beckman Instruments GmbH, München), wurden die Bakterien pelletiert.

Das Bakterienpellet wurde in 30 ml Lysispuffer resuspendiert und auf Eis gekühlt.

Die Bakterienzellen wurden mithilfe einer Zellpresse mechanisch aufgebrochen. Die Zellsuspension wurde dreimal in der Zellpresse behandelt.

Das Lysat wurde für 10 min bei 8000 rpm (4°C, JA20, Beckman Instruments GmbH, München) zentrifugiert.

Das Pellet wurde in 20 ml Detergenspuffer resuspendiert und erneut für 5 min zentrifugiert.

Das Pellet wurde in 20 ml Tritonpuffer aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur über Kopf gedreht.

Nach einer weiteren Zentrifugation wie oben, wurde das Pellet nochmals in 20 ml Tritonpuffer gewaschen.

Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 2 ml Tris-Puffer aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

2.6.2 5 ml Kulturvolumen

Zur Präparation kleiner Mengen von verschiedenen Lhcb1-Proteinen wurde eine etwas abweichende Methode herangezogen. Dabei wurden die Bakterienzellen nicht mechanisch in einer Zellpresse aufgebrochen, sondern die Zellwand wurde enzymatisch durch Lysozym aufgespalten.

Material:

- LB-Amp: 1 % Bacto Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 1 % NaCl; pH 7,5; 100 µg/ml Ampicillin
- Lysispuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8); 25 % Saccharose; 1 mM EDTA; 20 mg/ml Lysozym (wurde erst unmittelbar vor Gebrauch zugesetzt.)
- Detergenspuffer: 200 mM NaCl; 1 % Desoxycholsäure; 1 % Triton-X-100; 20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 2 mM EDTA; 10 mM β-Mercaptoethanol
- Tritonpuffer: 0,5 % Triton-X-100; 1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 10 mM β-Mercaptoethanol
- Tris-Puffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8); 1 mM EDTA; 10 mM β-Mercaptoethanol

Durchführung:

5 ml LB-Amp-Medium wurden mit einer Kolonie des gewünschten Klons angeimpft und über Nacht bei 37°C im Kulturschüttler (150 rpm) inkubiert.

200 ml dieser Über-Nacht-Kultur wurden zu 5 ml frischem LB-Amp-Medium gegeben und für 1 h bei 37°C im Kulturschüttler (150 rpm) inkubiert.

Nach Zugabe von 5,2 µl 1 M IPTG wurde die Kultur für weitere 4 h bei 37°C unter Schütteln (150 rpm) inkubiert.

Die Bakterienkultur wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und die Zellen wurden durch Zentrifugation (3 min, 8000 rpm, Tischzentrifuge) pelletiert.

Das Bakterienpellet wurde in 360 µl Lysispuffer mit Lysozym resuspendiert und für 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt.

Um die DNA abzubauen, wurden 5 µg DNaseI, 8 µl 1 M MgCl₂ und 0,8 µl 1 M MnCl₂ zugegeben und der Ansatz für weitere 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt.

Nach dem DNase-Verdau wurde 1 ml Detergens-Puffer zugegeben, der Ansatz wurde gemischt und für 5 min bei 8000 rpm (4°C, Rotor 1414, Hettich) zentrifugiert.

Das Protein-Pellet wurde in 1 ml Tritonpuffer resuspendiert. Zur Homogenisierung wurde die Suspension mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde die Suspension für 15-20 min bei Raumtemperatur geschüttelt.

Nach der Inkubation wurde die Suspension für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Falls das Proteinpellet zu diesem Zeitpunkt noch keine rein weiße Farbe hatte, wurde der Triton-Waschschritt wiederholt.

Das Protein-Pellet wurde in 50 µl Tris-Puffer resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.6.3 Expression in Mikrotiterplatten

In einigen Fällen wurde eine Expression in Mikrotiterplatten durchgeführt. Auch in diesem Fall wurde die Bakterienzellwand enzymatisch durch Lysozym aufgespalten.

Material:

- LB-Amp: 1 % Bacto Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 1 % NaCl; pH 7,5; 100 µg/ml Ampicillin
- Lysispuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8); 25 % Saccharose; 1 mM EDTA; 20 mg/ml Lysozym (erst unmittelbar vor Gebrauch zusetzen.)
- 3-4 x Sparmix: 4 % SDS; 1,4 M β-Mercaptoethanol; 24 % Glycerin; 0,1 M Tris-HCl (pH 6,8); 0,4 mM Bromphenolblau

Durchführung:

Je 200 µl LB-Amp in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden mit Zellmaterial aus einer Bakterienkolonie angeimpft. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

Eine zweite Mikrotiterplatte wurde mit jeweils 40 µl LB-Amp befüllt. Mithilfe eines sterilen Replikators wurden Bakterien aus den Über-Nacht-Kulturen in die neue Platte transferiert. Um die Zellzahl zu erhöhen, wurde der Transferschritt 3 x wiederholt. Die Originalplatte wurde verschlossen und bei 4°C für höchstens eine Woche gelagert.

Nach 1 h bei 37°C wurden 10 µl 1 M IPTG in jede Vertiefung der frischen Mikrotiterplatte gegeben und die Platte wurde für weitere 4 h bei 37°C inkubiert.

Die Platten wurden für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert (Rotor 1422, Hettich, Tuttlingen).

Der Überstand wurde mithilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Die Zellen wurden in 20 µl Lysispuffer mit Lysozym resuspendiert und für 10 min bei Raumtemperatur geschwenkt.

2 µg DNaseI wurde zugegeben und die Platte wurde für weitere 10 min bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert.

Die Proteine wurden ohne weitere Aufreinigung durch die Zugabe von 10 µl 3-4 x Sparmix gelöst und für weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend konnten die Proteine in einer denaturierenden SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt werden.

2.7 Rekonstitution von Pigment-Protein-Komplexen

Lhcb1-Apoproteine wurden *in vitro* mit Pigmenten zu monomeren LHCIIB-Komplexen rekonstituiert, die die gleichen Eigenschaften zeigen wie native LHCIIB-Komplexe (Paulsen et al., 1990). Dazu wurde das Apoprotein in SDS oder Guanidiniumhydrochlorid denaturiert und mit den Pigmenten gemischt. Das denaturierende Detergens wurde dabei entweder durch die Zugabe einer Lösung des nicht-ionischen Detergens OG verdünnt oder nach Zugabe von OG als schwerlösliches Kaliumsalz ausgefällt, um eine Detergensumgebung zu erreichen, die die Rekonstitution des LHCIIB erlaubte. Lediglich bei einer Rekonstitution durch Frier-Tau-Zyklen blieb die SDS-Konzentration unverändert bei 2 %.

2.7.1 Pigmente

Die Rekonstitutionen wurden mit Totalpigmentextrakten aus Erbsenblättern (Paulsen et al., 1990) durchgeführt. Wie durch HPLC-Analysen (Hobe et al., 2000) bestätigt, enthielten diese Extrakte Chl *a* und Chl *b* in einem molaren Verhältnis von 3-4 : 1 und ein molares Xanthophyll-/Chlorophyll-Verhältnis von 0,2. Die Gesamtchlorophyllkonzentrationen der Rekonstitutionslösungen sind bei den jeweiligen Experimenten angegeben.

Teilweise, wie angegeben, wurden die Rekonstitutionen bei erhöhtem Xanthophyllgehalt durchgeführt. Die Gesamt-xanthophylle wurden durch Verseifung der Chlorophylle mit KOH und anschließender Extraktion der Carotenoide mit Diethylether aus dem Totalextrakt gewonnen (Paulsen et al., 1990). Der Carotenoid-Extrakt wurde nicht weiter aufgereinigt, sondern als Gesamt-xanthophyll eingesetzt. Die Xanthophylle Lutein, Neoxanthin und Violaxanthin waren in einem Gewichtsverhältnis von ca. 3 : 1 : 1 im Gesamt-xanthophyllextrakt enthalten.

2.7.2 SDS-Verdünnung

Bei einer Rekonstitution durch SDS-Verdünnung (Booth et al., 1996), wurde das Lhcb1-Protein in 0,2 % SDS gelöst und mit dem gleichen Volumen an Pigmentlösung in 2 % (w/v) OG gemischt. Durch diesen Schritt werden OG-SDS-Mischmizellen gebildet. Aufgrund ihrer Hydrophobizität werden Lhcb1 und die Pigmente in den Mizellen konzentriert und in ausreichende Nähe zueinander gebracht, so dass die Rekonstitution stattfinden kann. Durch die Zugabe der Pigmentlösung wurde die SDS-Konzentration auf 0,1 % und damit auf eine Konzentration gesenkt, die nicht länger destabilisierend wirkt.

Material:

- Totalextrakt: getrocknet, mit 25 µg Chlorophyll (siehe oben). Veränderte Pigmentgehalte sind bei den jeweiligen Experimenten angegeben.
- 2 x Rekonstitutionspuffer: 200 mM Lithiumboratpuffer (pH 9) bzw. 200 mM NaP-Puffer (pH 7,5); 25% Saccharose; 10 mM DTT. PH-Wert und DTT-Gehalt wurden für einige Anwendungen verändert, wie bei den jeweiligen Experimenten angegeben.
- Proteinlösung: 36,7 µg Lhcb1 (6,2 µM) bzw. Bakteriophagen in der angegebenen Konzentration; 2,32 µl 10% SDS; 58 µl 2 x Rekonstitutionspuffer. Mit H₂O auf 116 µl auffüllen. Die Proteinlösung wurde für 2 min gekocht. Falls die Rekonstitution mit Bakteriophagen-gebundenem Lhcb1 durchgeführt wurde, wurde auf das Kochen der Proteinlösung verzichtet.
- OG-Lösung: 23,2 µl 10% OG; 58 µl 2 x Rekopuffer; 34,8 µl H₂O. Die OG-Lösung wurde für 15 min im Ultraschallbad sonifiziert.

Durchführung:

Zunächst wurde die OG-Lösung unter Mischen zu den Pigmenten gegeben, die unmittelbar vor diesem Schritt in 3 µl 100 % Ethanol gelöst wurden. Die so hergestellte Pigmentlösung wurde für weitere 30 sec heftig gemischt.

Die Proteinlösung wurde unter Mischen zur Pigmentlösung gegeben und der Rekonstitutionsansatz wurde für weitere 30 sec heftig gemischt. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann bis zur weiteren Analyse auf Eis gehalten.

2.7.3 Detergenswechsel

Bei einer Rekonstitution durch Detergenswechsel (Paulsen et al., 1993) liegen die Proteine zunächst denaturiert in 2% LDS vor und werden mit den Pigmenten gemischt. Anschließend wurde das nicht-ionische Detergens Octylglycosid bis zu einer Endkonzentration von 1 % zugegeben. Dabei entstehen LDS-OG-Mischmizellen. Durch Ausfällen des LDS mit KCl wurde die LDS-Konzentration so weit erniedrigt, dass die Rekonstitution erfolgen konnte.

Material:

- Totalextrakt: getrocknet, mit 100 µg Chlorophyll (siehe oben). Veränderte Pigmentgehalte sind bei den jeweiligen Experimenten angegeben.
- 2 x Solubilisierungspuffer: 200 mM Tris/HCl (pH 9); 25% [w/v] Saccharose; 4% LDS. Der pH-Wert wurde für einige Anwendungen variiert und ist bei den jeweiligen Experimenten angegeben. Teilweise enthielt der zweifach konzentrierte Puffer 10 mM ε-Aminocaprinsäure und 2 mM Benzamidin. Für einige Experimente wurde bei pH 8 rekonstituiert. Die Abweichungen vom oben genannten Standard-Puffer sind bei den jeweiligen Experimenten angegeben.
- Proteinlösung: 100 µl mit 0,4 µg/µl Protein bzw. die angegebene Bakteriophagenmenge in 1x Solubilisierungspuffer. Die Proteinlösung wurde für 1 min gekocht. Bei der Rekonstitution von Bakteriophagen-gebundenem Lhcb1 wurde auf das Kochen verzichtet.

Durchführung:

Die abgekühlte Proteinlösung wurde gegebenenfalls mit 10 µl 10 bzw. 100 mM DTT versetzt. Der DTT-Gehalt des Rekonstitutionsansatzes wurde variiert und ist bei den jeweiligen Experimenten angegeben.

Die Pigmente wurden unmittelbar vor der Rekonstitution in 5 µl 100 % Ethanol aufgenommen.

Die Proteinlösung wurde unter Mischen zu den gelösten Pigmenten gegeben und der Ansatz wurde für weitere 30 sec heftig gemischt.

Unter Mischen wurden 15 µl 10 % OG zugegeben. Nach weiteren 10 sec heftigen Mischens wurde der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden 15 µl 2 M KCl zugegeben und der Ansatz zum Präzipitieren des KDS für mindestens 5 min auf Eis inkubiert.

Das schwerlösliche KDS wurde durch eine einminütige Zentrifugation bei 12000 rpm und 4°C abgetrennt.

Der Überstand, der die rekonstituierten Pigment-Protein-Komplexe enthielt, wurde bis zur weiteren Analyse auf Eis aufbewahrt.

2.7.4 Frier-Tau-Zyklen

Bei einer Rekonstitution durch Frier-Tau-Zyklen (Paulsen et al., 1990) wurden die Proteine in 2 % LDS mit den Pigmenten gemischt. Anschließend wurden die Rekonstitutionsansätze dreimal eingefroren und wieder aufgetaut, was die Bildung der Pigment-Protein-Komplexe induzierte.

Material:

- Totalextrakt: getrocknet, mit 100 µg Chlorophyll und erhöhtem Xanthophyllgehalt (insgesamt 40 µg).
- 2 x Solubilisierungspuffer: 200 mM Tris-HCl (pH 9); 25 % (w/v) Saccharose; 4 % LDS; 10 mM ε-Aminocapronsäure; 2 mM Benzamidin.
- Proteinlösung: 100 µl mit 0,4 µg/µl Protein in 1x Solubilisierungspuffer. Die Proteinlösung wurde für 1 min gekocht.

Durchführung:

Die abgekühlte Proteinlösung wurde mit 1 µl 1 M DTT versetzt.

Die Pigmente wurden unmittelbar vor der Rekonstitution in 5 µl 100 % Ethanol aufgenommen.

Die Proteinlösung wurde unter Mischen zu den gelösten Pigmenten gegeben und der Ansatz wurde für weitere 30 sec heftig gemischt.

Die Rekonstitutionsansätze wurden für 30 min bei -20°C eingefroren und anschließend für 30 sec bei 20°C im Wasserbad wieder aufgetaut.

Die Ansätze wurden nochmals eingefroren und wieder aufgetaut, wie oben beschrieben.

Nach einem dritten Einfrieren wurden die Ansätze schließlich auf Eis aufgetaut und die Pigment-Protein-Komplexe sofort in einer schwach denaturierenden Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.7.5 Guanidiniumhydrochlorid-Rekonstitution und Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Bei einer Guanidiniumhydrochlorid-Rekonstitution (Yang et al., 2003) lagen die Proteine zunächst denaturiert in 6 M Guanidiniumhydrochlorid vor. Die Proteinlösung wurde unter kräftigem Mischen zu einer Pigmentlösung mit 2,5 % OG gegeben. Dabei wurde die Guanidiniumhydrochlorid-Konzentration um Faktor 10 gesenkt. Der Übergang der Proteine aus der Guanidiniumhydrochlorid-Lösung in die OG-Lösung ist außerordentlich kritisch, da die Proteine nicht wie bei einer Rekonstitution in Anwesenheit von SDS von Detergensmolekülen begleitet werden. Ungenügendes Mischen führt daher zur sofortigen Aggregation der Proteine.

Pigment-Protein-Komplexe, die nach Denaturierung der Apoproteine in Guanidiniumhydrochlorid rekonstituiert wurden, wurden vor einer weiteren Untersuchung durch eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt.

Material:

- Totalextrakt: getrocknet, mit 1,5 mg Chlorophyll (siehe oben).
- Rekonstitutionspuffer: 50 mM Natriumborat (pH 9); 12,5% (w/v) Saccharose; 10 mM β-Mercaptoethanol; 2,5 % OG

- Proteinlösung: 600 µg Protein in Form von Inclusion Bodies abzentrifugieren, die Flüssigkeit abziehen und das Proteinpellet in 37,5 µl H₂O resuspendieren. 112,5 µl 8 M Guanidiniumhydrochlorid zugeben und die Proteine durch heftiges Mischen und Behandlung im Ultraschallbad in Lösung bringen.
- Saccharose-Dichtegradienten: Die Gradientenlösung (0,4 M Saccharose; 0,1 % LM; 5 mM Tricine (pH 7,8); 0,4 mM TCP) wurde in SW41-Zentrifugenröhrchen gefüllt und mindestens über Nacht bei -20°C eingefroren. Vor dem Auftrag der Proben wurden die Gradienten bei 4°C aufgetaut und die obersten 500 µl Flüssigkeit wurden entfernt.

Durchführung:

Die getrockneten Pigmente wurden unmittelbar vor der Rekonstitution in 150 µl eiskaltem Ethanol (100 %) aufgenommen.

Die Pigmente wurden vollständig unter Mischen zu 1,5 ml Rekonstitutionspuffer in einem 50 ml-Schraubdeckelzentrifugenröhrchen gegeben. Die Lösung wurde für weitere 30 sec gemischt.

Anschließend wurden 150 µl Proteinlösung in 6 M Guanidiniumhydrochlorid ebenfalls unter Mischen zugegeben. Auch nach diesem Schritt wurde für weitere 30 sec gemischt.

Der Ansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur und anschließend für 20 min auf Eis inkubiert.

In einer zweiminütigen Zentrifugation bei 14000 rpm (4°C, Rotor 1412, Hettich, Tuttlingen) wurden Pigmentaggregate abgetrennt.

Der Überstand mit den Pigment-Protein-Komplexen wurde bis zur weiteren Analyse auf Eis aufbewahrt.

Vor der anschließenden Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation wurde der Ansatz im Verhältnis 1 : 1 mit Rekonstitutionspuffer ohne OG und ohne Saccharose verdünnt und erneut für 2 min bei 14000 rpm (4°C, Rotor 1412, Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert.

Ca. 1-1,5 ml Probe wurde auf einen Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen. Anschließend wurde für 16 h bei 37000 rpm und 4°C zentrifugiert (Rotor: SW41Ti, Beckman Instruments GmbH, München).

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Die aromatischen Aminosäuren eines Proteins absorbieren Licht der Wellenlänge 280 nm. Bei Kenntnis des Extinktionskoeffizienten kann daher die Absorption einer Proteinlösung bei einer Wellenlänge von 280 nm zur Bestimmung des Proteingehaltes herangezogen werden. Für das Lhcb1-Protein lässt sich die Proteinkonzentration nach folgender Formel berechnen (Hobe, mündliche Mitteilung):

$$0,1 \text{ OD}_{280 \text{ nm}, 1 \text{ cm}} = 53 \text{ µg / ml}$$

Material:

- A₂₈₀-Puffer: 10 mM Tris pH (6,8); 2 % SDS

Durchführung:

Zunächst wurden die Proteinlösungen/-suspensionen mit A₂₈₀-Puffer verdünnt und in Eppendorfgefäßen für 5 min gekocht. Als Referenz wurde der Puffer der Proteinlösung/-suspension ohne Protein im gleichen Verhältnis mit A₂₈₀-Puffer verdünnt und ebenfalls

gekocht. Von jeder Probe und der Referenz wurden je drei parallele Verdünnungen hergestellt.

Zur Definition des Nullwertes wurden die Vertiefungen einer UV-durchlässigen Mikrotiterplatte (Greiner Labortechnik, Frickenhausen) zunächst mit jeweils 150 µl A₂₈₀-Puffer befüllt und die Absorption bei 280 nm wurde bestimmt (SPEKTRAmAXPLUS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA, Software: SoftmaxPRO).

Nach Leeren der Vertiefungen wurden jeweils 150 µl der gekochten und abgekühlten Proben eingefüllt und die Absorption gemessen.

Die Absorption der Referenz wurde von der Absorption der Proben abgezogen und die Proteinkonzentrationen wurden nach der oben genannten Formel berechnet.

Zur Herstellung von Lösungen mit definierten Proteingehalten aus Inclusion Body-Suspensionen wurde zunächst die ungefähre Proteinkonzentration in der Inclusion Body-Suspension bestimmt. Die Proteine wurden zunächst in höherer Konzentration gelöst. Nach einer Bestimmung des tatsächlichen Proteingehaltes der vorläufigen Lösung wurde auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt.

2.8.2 Acetonfällung von Proteinen

Zur Fällung von Proteinen aus einer Lösung wurde die Lösung zunächst mit 1/10 Volumen Essigsäure angesäuert. Anschließend wurden 2,3 Volumen 100 % Aceton zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und für mindestens 30 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde für 15 min bei 12000 rpm, 4°C (Rotor 1412, Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde mit 70 % Ethanol überschichtet und erneut für 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert (4°C). Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet wurde mit 100 % Ethanol überschichtet und zentrifugiert wie oben. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet für 10 min unter Vakuum (Vacuum Concentrator, Bachhofer, Reutlingen) getrocknet.

2.8.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurden zur Auftrennung denaturierter Proteine nach ihrem Molekulargewicht und zur Isolierung von Pigment-Protein-Komplexen unter schwach denaturierenden Bedingungen durchgeführt.

2.8.3.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Durch eine denaturierende SDS-Gelelektrophorese können Proteine in einer Polyacrylamidmatrix nach ihren Molekulargewichten aufgetrennt werden. Dabei wird die Eigenladung der Proteine durch die gebundenen anionischen SDS-Moleküle überdeckt, die daher während der elektrophoretischen Auftrennung keine Rolle mehr spielt.

Durch die Copolymerisation von Acrylamidmonomeren mit dem Vernetzer Bisacrylamid entsteht eine Netzstruktur, deren Porenweite von der Totalacrylamidkonzentration und dem Vernetzungsgrad abhängig ist. Totalacrylamidkonzentration (T) und Vernetzungsgrad (C) berechnen sich nach folgenden Formeln:

$$T = \frac{(g \text{ Acrylamid} + g \text{ Bisacrylamid}) \times 100}{\text{Gellösungsvolumen [ml]}} \quad [\%]$$

$$C = \frac{g \text{ Bisacrylamid} \times 100}{g \text{ Acrylamid} + g \text{ Bisacrylamid}} \quad [\%]$$

Die negativ geladenen, SDS-denaturierten Proteine wandern durch diese Netzstruktur zur Anode, wobei die Laufgeschwindigkeit umso größer ist, je kleiner die Proteine sind. Durch Vergleich mit einem Molekulargewichtsstandard konnten die Molekulargewichte der Proteine bestimmt werden.

SDS-7-Marker (Sigma-Aldrich, München):

Rinderserumalbumin	66,0 kDa
Ovalbumin	45,0 kDa
NADPH	36,0 kDa
Carboanhydrase	29,0 kDa
Trypsinogen	24,0 kDa
Trypsin-Inhibitor	20,1 kDa
α -Lactalbumin	14,2 kDa

2.8.3.1.1 Gelsystem nach Lämmli (1970)

Während der diskontinuierliche Elektrophorese nach Lämmli (1970) werden die Protein-Proben zunächst in einem Sammelgel mit einem Totalacrylamidgehalt von 4,7 % fokussiert. Zur Auftrennung der Proteine nach ihren Molekulargewichten kommt es erst im nachfolgenden Trenngel mit einem deutlich höheren Acrylamidgehalt. In der vorliegenden Arbeit wurden Trenngel mit Totalacrylamidkonzentrationen von 10,1; 12,3 und 15,4 % verwendet.

Material:

- Gellösungen: (für ca. 10 Gele)

Stammlösungen	Trenngel (15,4 % T; 3,2 % C)	Trenngel (12,3 % T; 3,2 % C)	Trenngel (10,1 % T; 3,2 % C)	Sammelgel (4,7%; 3,2 % C)
30 % Acrylamid/ 1 % Bisacrylamid	27,4 ml	22 ml	18 ml	6,0 ml
1 M Tris-HCl (pH 8,8)	22,6 ml	22,6 ml	22,6 ml	---
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	---	---	---	5,2 ml
80 % Glycerin	3,4 ml	3,4 ml	3,4 ml	5,0 ml
H ₂ O	1,8 ml	7,2 ml	11,2 ml	23,4 ml
Lösungen vor Zugabe von APS und TEMED entgasen. APS und TEMED erst unmittelbar vor dem Einfüllen der Gellösungen in die Gelgießkammer zugeben.				
APS 10%	400 μ l	400 μ l	400 μ l	200 μ l
TEMED	26 μ l	26 μ l	26 μ l	20 μ l

Tab. 2.8: Lösungen für Lämmli-Gele

- 3-4 x Sparmix: 100 mM Tris-HC (pH 6,8); 1,4 M β -Mercaptoethanol; 4 % (w/v) SDS; 24 % (v/v) Glycerin; 0,4 mM Bromphenolblau
- SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris-Base; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS; 0,5 mM EDTA

Durchführung:

Zur Herstellung der Gele wurden zunächst die Trenngellösungen unmittelbar nach der Zugabe von APS und TEMED in die Gelgießapparatur des Midget-Gelsystems (Amersham

Pharmacia Biotech, Freiburg) gegossen. Wenn nicht anders beschrieben, wurden Gele mit einer Stärke von 0,75 mm verwendet.

Nach Polymerisation des Trenngels wurde die Sammelgellösung zugegeben, die Taschenkämme wurden eingesteckt und die Polymerisation der Gelmatrix wurde abgewartet.

Die so hergestellten Polyacrylamidgele konnten bei 4°C für bis zu zwei Wochen gelagert werden.

Die Proteinproben wurden mit ¼ bis ½ ihres Volumens an 3-4 x Sparmix versetzt und für 1 min gekocht.

Anschließend wurden die Proben in die Taschen des Polyacrylamidgels aufgetragen.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei Raumtemperatur, bis die Bromphenolblau-Front in das Trenngel eingewandert war, wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Nachdem die Bromphenolblau-Front das Trenngel erreicht hatte, wurde die Spannung auf 150 bis 180 V erhöht.

2.8.3.1.2 Gelsystem nach Schägger und von Jagow (1987)

Eine abgewandelte diskontinuierliche Gelelektrophorese nach Schägger und von Jagow (1987) wurde speziell zur Auftrennung kleiner Proteine herangezogen. Der Vorteil dieser Methode bei der Auftrennung von Proteinen im Bereich von 5 bis 30 kDa ist hauptsächlich auf die Verwendung des Tricins als Folge-Ion zurückzuführen (Schägger et al., 1987).

Im weitporigen Sammelgel der diskontinuierlichen Gelelektrophorese ist die Geschwindigkeit der Ionen zunächst nur von ihrer Ladungsdichte abhängig. Die Proteine werden zwischen einem Leitton mit einer hohen Ladungsdichte und daher hoher Mobilität und einem Folgeion mit niedriger Ladungsdichte, d.h. geringer Mobilität fokussiert. Als Leitton wird sowohl im Lämmli- als auch im Schägger-Gelsystem Cl⁻ verwendet. Das Tricin hat bei pH 6,8 bis 8,8 eine wesentlich höhere Mobilität als Glycin und führt daher zu einer stärkeren Fokussierung der kleineren Proteine. Proteine mit Molekulargewichten über 100 kDa können dagegen nicht in einem Tris-Tricine-System aufgetrennt werden (Schägger et al., 1987).

Material:

- Gellösungen: (für ca. 5 Gele)

Stammlösungen	Trenngel (16,5 % T; 3 % C)	Sammelgel (4 % T; 3 % C)
48 % Acrylamid/ 1,5 % Bisacrylamid	10 ml	1,8 ml
3 M Tris-HCl (pH 8,45)	10 ml	5,58 ml
80 % Glycerin	5 ml	---
H ₂ O	5 ml	15,12 ml
Lösungen vor Zugabe von APS und TEMED entgasen. APS und TEMED erst unmittelbar vor dem Einfüllen der Gellösungen in die Gelgießkammer zugeben.		
APS 10%	100 µl	75 µl
TEMED	10 µl	8 µl

Tab. 2.9: Lösungen für Schägger-Gele

- 4 x Probenpuffer: 12 % SDS (w/v); 6 % β-Mercaptoethanol (v/v); 30 % Glycerin (w/v); 150 mM Tris-HCl (pH 7). Bei ungefärbten Proteinproben kann 0,05 % Serva Blau G zugegeben werden.
- Anodenpuffer: 0,15 M Tris-HCl (pH 8,9 einstellen)

- Kathodenpuffer: 0,1 M Tris-Base; 0,1 M Tricin; 0,1 % SDS; pH-Wert nicht einstellen.

Durchführung:

Die Gele wurden wie oben beschrieben hergestellt.

Die Proteinproben wurden mit $\frac{1}{4}$ ihres Volumens an 4 x Probenpuffer versetzt und für 1 min gekocht.

Nach Einfüllen der Proteinproben in die Taschen des Sammelgels wurde zunächst eine Spannung von 30 V angelegt, bis die Proben vollständig in das Sammelgel eingelaufen sind. Anschließend wurde die Spannung auf 150 V erhöht, bis die Pigment-/Farbstofffront das Trenngel erreichten. Die Spannung wurde auf 70 V reduziert, bis die Proben das Trenngel zu $\frac{2}{3}$ durchquert hatten. Für das letzte Drittel des Trenngels wurde die Spannung auf 180 V erhöht.

2.8.3.2 Schwach denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Unter schonenden Bedingungen ist die Isolierung von Pigment-Protein-Komplexen mithilfe einer Gelelektrophorese möglich. Die Auftrennung erfolgte auf denselben Gelen, die für denaturierende Gelelektrophoresen nach Lämmli (1970) verwendet wurden. Die Elektrophorese wurde bei reduzierter Spannung und bei 4°C durchgeführt. Die Elektrophorese wurde entweder mit LDS-Laufpuffer oder mit Deriphat-Laufpuffer durchgeführt, wie in den Experimenten angegeben.

Material:

- Polyacrylamidgele (zur Herstellung vergleiche Kap. 2.8.3.1.1). Die Gele wurden nach der Herstellung mindestens 10 h bei 4°C gelagert.
- LDS-Laufpuffer: 25 mM Tris-Base; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) LDS; 0,5 mM EDTA
- Deriphat-Laufpuffer: 12 mM Tris-Base; 0,15 % (w/v) Deriphat (Cognis Deutschland GmbH Co. KG, Düsseldorf); 48 mM Glycin

Durchführung:

Die rekonstituierten Proteine wurden ohne Vorbehandlung auf die Polyacrylamidgele aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde bei 4°C durchgeführt, wobei eine Belichtung der Proben vermieden wurde.

Zunächst wurde eine Spannung von 40 V angelegt, bis die Proben vollständig in das Sammelgel eingelaufen waren.

Anschließend wurde die Spannung auf 100 V erhöht.

2.8.3.3 Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliant Blau

Unpigmentierte Proteine wurden im Gel durch Anfärben mit Coomassie-Brilliant-Blue, einem Trimethylmethanfarbstoff, sichtbar gemacht.

Material:

- Färbelösung: 0,175 % Coomassie Brilliant Blue (Serva); 50 % (v/v) Ethanol; 7 % (v/v) Essigsäure
- Entfärber: 20 % Ethanol; 7 % Essigsäure
- Entfärber: 10 % Essigsäure

Durchführung:

Zum Färben wurden die Gele mindestens 15 min in der Färbelösung inkubiert. Dann wurde das Gel zunächst mit dem 1. Entfärber entfärbt, bis die ersten Proteinbanden sichtbar wurden. Anschließend wurde das Gel in den 2. Entfärber überführt, in dem es inkubiert wurde, bis der Hintergrund vollständig entfärbt war.

2.8.3.4 Quantifizierung der Proteinbanden

Zur Quantifizierung der Coomassie-gefärbten Proteinbanden wurden die Gele in einer VersaDoc-Anlage (BioRad, München) fotografiert. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit dem Programm „QuantityOne“. Dabei wurde die Intensität der Proteinbanden als Vergleichsbasis für die Proteinmengen herangezogen.

2.8.4 Western Blot

Zum spezifischen Nachweis bestimmter Proteine wurde ein elektrophoretisch aufgetrenntes Proteingemisch zunächst aus der Gelmatrix auf eine proteinbindende Membran (Nitrocellulose oder PVDF) übertragen. Dieser Transfer wurde mithilfe einer angelegten elektrischen Spannung in einem Tank-Blot-Verfahren erreicht. Auf der Membran konnten die Proteine z.B. durch Antikörper nachgewiesen werden.

Material:

- Western Blot-Puffer: 20 mM Tris-Base; 0,15 M Glycin; 20 % Methanol (v/v); 0,05 % SDS. Der Puffer wurde bei 4°C aufbewahrt und maximal fünfmal verwendet.
- Tankblotsystem: LKB 2051 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Filterpapier: GB002 (Schleicher und Schuell, Dassel). Benötigt werden zwei Filterpapiere pro Blot, eingeweicht in Western Blot Puffer.
- PVDF-Membran: Fluorotrans, Porenweite 0,2 µm (PALL, Dreieich), aktiviert in Methanol, eingeweicht in Western Blot-Puffer.
- Nitrocellulose-Membran: Optitran BA-S, Porenweite 0,2 µm in Gelgröße (Schleicher und Schuell, Dassel), eingeweicht in Western Blot-Puffer.
- Ponceau-S-Färbelösung: 0,2 % (w/v) Ponceau S; 3 % (w/v) Trichloressigsäure; in destilliertem Wasser.

Durchführung des Elektrotransfers:

Das ungefärbte Proteingel wurde zunächst für einige Minuten in Western Blot-Puffer equilibriert.

Die Transfereinheit setzte sich folgendermaßen zusammen (von der Kathodenseite zur Anodenseite):

Schaumstofflage, mit Western-Blot-Puffer getränkt
 eingeweichtes Filterpapier
 equilibriertes Proteingel
 evtl. aktivierte und equilibrierte Membran
 eingeweichtes Filterpapier
 Schaumstofflage, mit Western-Blot-Puffer getränkt

Beim Aufbau der Transfereinheit wurde darauf geachtet, Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen zu vermeiden. Die vorgekühlte Tankblotkammer (4°C) wurde mit kaltem Western-

Blot-Puffer befüllt, bis die Elektroden bedeckt waren. Die Transfereinheiten wurden in der richtigen Orientierung (Kathodenseite in Richtung Kathode) in die Tankblotkammer eingestellt. Der Puffer wurde während des Elektrotransfers mithilfe eines Magnetrührers leicht gerührt. Außerdem wurde die Tankblotkammer gekühlt (4°C), um eine Überhitzung wegen der hohen Stromstärke zu vermeiden.

Der Transfer erfolgte innerhalb von 90 min bei einer Stromstärke von 146 mA (0,75 mm Gele) bzw. innerhalb von 2 h bei 160 mA (1,5 mm Gele).

Bei Verwendung der Nitrocellulosemembran wurden die Banden des Molekulargewichtsstandards durch eine transiente Proteinfärbung sichtbar gemacht und mit Kugelschreiber markiert. Dazu wurde die Membran für wenige Minuten in eine Ponceau-S-Färbelösung eingelegt. Dabei wurde zunächst die gesamte Membran rot gefärbt. Durch Spülen mit destilliertem Wasser wurde der Hintergrund entfärbt und die Proteinbanden traten rot hervor. Nach einer Markierung der Markerbanden wurde die Membran durch weiteres Spülen mit destilliertem Wasser komplett entfärbt.

2.8.4.1 Nachweis von Lhcb1-Proteinen oder His₆-Tags mithilfe von Antikörpern

Der Nachweis von Lhcb1-Proteinen oder His₆-Tags nach einer Blockierung der unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Membran erfolgte mithilfe von Antikörpern. Dabei wurden die Proteine auf der Membran zunächst durch einen spezifischen Antikörper gebunden. Dieser Antikörper konnte im zweiten Schritt mithilfe eines weiteren Antikörpers, der an eine Alkalische Phosphatase gekoppelt war, nachgewiesen werden.

	Erster Antikörper	Zweiter Antikörper
Lhcb1-Nachweis	Anti-Lhcb1-Antiserum aus Kaninchen. Hergestellt durch Immunisierung mit SDS-denaturiertem Lhcb1-Protein. Blutentnahme am 30.12.1999 (zweites Serum) aus Kaninchen SA7430 (Eurogentec, Herstal, Belgien)	Anti-Kaninchen-IgG aus Schaf, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase (Chemicon, Hofheim/Ts.)
His₆-Nachweis	Penta-His Antikörper (IgG1) aus Maus (Quiagen, Hilden)	Anti-Maus-IgG aus Schaf, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase (Sigma-Aldrich; Steinheim)

Tab. 2.10: Verwendete Antikörper.

Der Nachweis der gekoppelten Alkalischen Phosphatase erfolgte entweder durch Umsetzung der chromogenen Substrate BCIP und NBT oder mithilfe eines Chemilumineszenz-Substrates.

Material:

- Blockierungs-/Waschpuffer und Antikörperlösungen

	Blocking-puffer	1. Antikörperlösung	2. Antikörperlösung	TBSTT	TBS
Lhcb1-Nachweis	3 % (w/v) BSA in TBS	SA7430 1 : 5000 in 1,5 % BSA in TBS	Anti-Kaninchen IgG 1 : 2500 in 1,5 % BSA in TBS	0,25 M NaCl; 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 0,025 % (v/v) Tween 20 ; 0,1 % (v/v) Triton-X-100	0,15 M NaCl; 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
His₆-Nachweis	3 % (w/v) BSA in TBS	100 ng/ml in 1,5 % BSA in TBS	Anti-Maus IgG 1 : 5000000 in 1,5 % BSA in TBS	0,5 M NaCl; 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 0,05 % (v/v) Tween 20; 0,2 % (v/v)	0,15 M NaCl; 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)

				Triton-X-100	
--	--	--	--	--------------	--

Tab. 2.11: Blockierungs-/Waschpuffer und Antikörperlösungen

- Substratlösung
 1. BCIP/NBT-Nachweis: 100 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl (pH 9,5); 5 mM MgCl₂; 0,165 mg/ml BCIP; 0,33 mg/ml NBT
 2. Chemilumineszenz: Immun Star AP Substrat (Biorad, München), 1 : 10 verdünnt in TBS

Durchführung:

Zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran in der Blockierungslösung inkubiert. Bei Verwendung der Nitrocellulosemembran wurde dieser Schritt entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C durchgeführt. PVDF-Membranen wurden immer über Nacht bei 4°C blockiert.

Nach der Blockierung wurde die Membran durch Schwenken in TBSTT und TBS gewaschen:
3 x 10 min in TBSTT

1 x 10 min in TBS

Anschließend wurde die Membran zusammen mit 5 ml der 1. Antikörperlösung in eine Plastikfolie eingeschweißt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde die Membran gewaschen wie oben.

Nach den Waschschrritten wurde die Membran zusammen mit 5 ml der 2. Antikörperlösung in eine Plastikfolie eingeschweißt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde die Membran gewaschen wie oben.

Der Nachweis der alkalischen Phosphatase erfolgte entweder durch Umsetzung des BCIP//NBT-Substrates oder mithilfe eines Chemilumineszenz-Substrates:

- BCIP/NBT-Nachweis: Die Membran wurde zusammen mit 5 ml der entsprechenden Substratlösung in eine Plastikfolie eingeschweißt und solange bei Raumtemperatur inkubiert, bis die Signale zu erkennen waren.
- Chemilumineszenz: Die Membran wurde in 20 ml Substratlösung eingelegt und für 10 min ohne Belichtung inkubiert. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Plastikfolien gelegt und die Chemilumineszenz wurde in einer Versa Doc-Anlage (Biorad, München) aufgenommen. Es wurden der kleinstmögliche Abstand zum Objektiv und die größtmögliche Blendenöffnung gewählt. Bis auf spezielle Anwendungen wurde eine Belichtungszeit von 5 min gewählt.

2.8.4.2 Biotin-Nachweis mithilfe von NeutrAvidin-AP

Biotin kann mithilfe verschiedener Biotin-bindender Proteine nachgewiesen werden. Gängige Biotin-bindende Proteine sind Avidin aus Hühnereiweiß und Streptavidin aus *Streptomyces avidinii*. In der vorliegenden Arbeit wurde das Avidin-Derivat NeutrAvidin (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA) verwendet, das sich lt. Hersteller durch geringere unspezifische Bindungsaffinitäten auszeichnet.

Material:

- Blockierungspuffer: 0,3 % Casein in TBST
- TBST: 0,15 M NaCl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,1); 0,05 % Tween 20

- NeutrAvidin-AP-Lösung: 1,8 µg/ml NeutrAvidin-AP (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA) in Blockierungspuffer
- Substratlösung: für BCIP/NBT-Nachweis, vgl. oben.

Durchführung:

Zur Absättigung der unspezifischen Proteinbindungsstellen wurde die Membran nach dem Elektrotransfer zunächst für 15 min bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Membran wurde nach der Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen 3-mal für 10 min in Blockierungspuffer gewaschen.

Anschließend wurde die Membran mit 5 ml NeutrAvidin-AP-Lösung in eine Plastikfolie eingeschweißt und für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dem erneuten Waschen, wie oben, wurde die Membran mit 5 ml Substratlösung in eine Plastikfolie eingeschweißt und inkubiert, bis die Signale sichtbar wurden.

2.8.5 Protease-Verdau

Rekonstituierte Pigment-Protein-Komplexe sind vor einem proteolytischen Verdau geschützt sein, während ungefaltete Apoproteine von Proteasen abgebaut werden (Paulsen et al., 1993). Dieser Unterschied zwischen rekonstituierten und nicht-rekonstituierten Lhcb1-Proteinen sollte in der vorliegenden Arbeit genutzt werden, um spezifisch nicht-rekonstituierte Lhcb1-Proteine abzubauen. Die Proteolysen mit verschiedenen Enzymen wurden daher im Allgemeinen unter Bedingungen durchgeführt, unter denen bestehende Pigment-Protein-Komplexe stabil sind. Die rekonstituierten Pigment-Protein-Komplexe wurden nicht aufgereinigt, der Protease-Verdau wurde in der Rekonstitutionslösung durchgeführt. Die verwendeten Carboxypeptidasen wurden ausgewählt, da sie nicht ausdrücklich als empfindlich gegenüber SDS beschrieben wurden.

2.8.5.1 Carboxypeptidasen

Carboxypeptidasen sind Proteasen, die jeweils die Peptidbindung hydrolysieren, die dem C-Terminus der Polypeptidkette am nächsten ist. Auf diese Weise wird eine Aminosäure nach der anderen vom C-Terminus des Proteins abgespalten. In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Carboxypeptidasen getestet, wobei keines der verwendeten Enzyme ein zufrieden stellendes Ergebnis lieferte.

2.8.5.1.1 Carboxypeptidase A

Carboxypeptidase A aus Rinderpankreas ist eine Metalloprotease, die ein Zink-Ion koordiniert zwischen zwei Imidazol-Ringen der Histidin-Seitenketten und der Carboxylgruppe eines Glutamates enthält. Nach den Angaben des Herstellers (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.) hydrolysiert Carboxypeptidase A bevorzugt aber nicht ausschließlich C-terminale Peptidbindungen. Peptidbindungen, an denen Glycin, Aspartat oder Glutamat beteiligt sind werden nur langsam hydrolysiert, Peptidbindungen zwischen Arginin bzw. Prolin und einer anderen Aminosäure werden nicht hydrolysiert.

Material:

- Carboxypeptidase A, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.

Durchführung:

Nach der Rekonstitution durch Detergenswechsel bei pH 8 wurde der Rekonstitutionsansatz mit Carboxypeptidase A in den angegebenen Endkonzentrationen und 0,01 mM ZnCl₂ versetzt.

Der Ansatz wurde für die angegebene Zeit bei 25°C oder auf Eis inkubiert.

Der Verdau wurde durch die Zugabe von 12 mM EDTA gestoppt.

Die Proben wurden anschließend mit 1/3 Volumen Sparmix versetzt und auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt.

2.8.5.1.2 Carboxypeptidase Y

Carboxypeptidase Y ist eine Serin-Protease aus *Saccharomyces cerevisiae*. Diese Protease spaltet spezifisch C-terminale Aminosäuren von Proteinen ab und wird zur Bestimmung C-terminaler Reste während einer Proteinsequenzierung verwendet. Carboxypeptidase Y hat eine Präferenz für hydrophobe Aminosäuren. C-terminale Aspartat- und Glycinreste werden dagegen nur langsam abgespalten.

Material:

- Carboxypeptidase Y, ICN Biomedicals GmbH, Eschwege

Durchführung:

Nach einer Rekonstitution durch Detergenswechsel bei pH 6,5 wurde der Rekonstitutionsansatz mit 62,5 mU Carboxypeptidase Y pro µg Protein versetzt und für 30 min bei 4°C oder Raumtemperatur inkubiert.

Die Proben wurden anschließend mit 1/3 Volumen Sparmix versetzt und auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt.

2.8.5.1.3 Carboxypeptidase P

Carboxypeptidase P aus *Penicillium janthinellum* kann laut Hersteller (Takara Shuzo CO., LTD, Shiga, Japan) jede C-terminale Aminosäure eines Proteins abspalten. Kontaminationen durch andere Proteasen sollen nicht vorliegen. Das Optimum dieses Proteins liegt allerdings stark im Sauren, bei pH 3,7.

Material:

- Carboxypeptidase P, Takara Shuzo CO., LTD, Shiga, Japan

Durchführung:

Zur Durchführung vgl. Carboxypeptidase Y.

2.8.5.2 Trypsin

Trypsin hydrolysiert Peptidbindungen zwischen der Carboxylgruppe einer basischen und der Amidgruppe einer beliebigen Aminosäure. Mithilfe eines Trypsin-Verdaus nach einer Detergenswechselrekonstitution wurden ungefaltete Proteine aus einer Mischung von Apoproteinen und Pigment-Protein-Komplexen entfernt. Der Trypsinverdau wurde unmittelbar im Anschluss an die Rekonstitution in der Rekonstitutionslösung durchgeführt.

Material:

- 100 mM HEPES-KOH (pH 8)
- 1 mg/ml Trypsin in sterilem destilliertem Wasser. Die Lösung wurde unmittelbar vor der Verwendung frisch angesetzt. Verwendet wurde Trypsin von Roche Applied Science,

Mannheim, bis auf das Experiment in Abb. 3.45, dort wurde Chymotrypsin-freies Trypsin von Sigma (Taufkirchen) verwendet.

- 20 mM TPCK in Ethanol
- 10 mM PMSF in Ethanol

Durchführung:

Zu einem Rekonstitutionsansatz nach Detergenswechselrekonstitution wurden 1/10 Volumen Hepes-KOH (pH 8), 1/10 Volumen Trypsinlösung und gegebenenfalls 1/20 Volumen TPCK zugegeben.

Der Ansatz wurde für 30 min bei 25°C ohne Belichtung oder wie angegeben inkubiert.

Der Verdau wurde durch Zugabe von 1/20 Volumen PMSF gestoppt.

2.8.6 SH-Gruppen-Markierung

Die Reaktionen mit SH-reaktiven Substanzen wurden unter zwei verschiedenen Bedingungen durchgeführt: Während der Blockierung wurden die Bedingungen so gewählt, dass bestehende Pigment-Protein-Komplexe stabil bleiben und entsprechend hauptsächlich die leichter zugänglichen SH-Gruppen der ungefalteten Proteine reagieren konnten. Bei der anschließenden Markierung sollte eine möglichst vollständige Markierung aller SH-Gruppen erreicht werden.

2.8.6.1 Selektive Blockierung zugänglicher SH-Gruppen in einer Mischung von Apoproteinen und Pigment-Protein-Komplexen

Die Blockierung der SH-Gruppen ungefalteter Proteine in einer Mischung von Apoproteinen und Pigment-Protein-Komplexen wurde in der Rekonstitutionslösung bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Rekonstitution durch SDS-Verdünnung wurde bei pH 7,5 durchgeführt und die SDS-Konzentration wurde nach der Rekonstitution auf 0,2 % erhöht. Auf DTT im Rekonstitutionspuffer wurde verzichtet.

Material:

- 1 % SDS
- 100 mM TCP in DMF
- Rhodaminmaleimid (Rhodamine RedTM C₂ maleimide) (Morbitec, Göttingen). Stammlösung: 8,5 – 10 mM in DMSO
- MIANS (2-(4'-maleimidylanilino)naphthalene-6-sulfonic acid, sodium salt) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Stammlösung: 10 mM in DMSO
- DMC (7-diethylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin) Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Stammlösung: 10 mM in DMSO
- BMPA (*N*-β-Maleimidopropionic acid) (Pierce, Rockford, IL, USA). Stammlösung: 10 mM in DMSO
- Pyrenylmaleimid (N-(1-Pyrenyl)maleimide) (Sigma, Taufkirchen). Stammlösung: 10-30 mM in DMSO
- Phenylmaleimid (*N*-Phenylmaleimide) (Sigma, Taufkirchen). Stammlösung: 10-30 mM in DMSO
- N-Ethylmaleimid (Sigma, Taufkirchen). Stammlösung: 10-30 mM in DMSO

- Biotin-BMCC (EZ-Link™ Biotin-BMCC) (Pierce, Rockford, IL, USA). Stammlösung: 8,5 – 10 mM in DMSO
- Jodacetamid (Merck KGaA, Darmstadt). Stammlösung: 10-40 mM in DMSO

Durchführung:

Die SDS-Konzentration der Rekonstitutionsansätze wurden durch Zugabe von 0,1 Volumen 1 % SDS von 0,1 auf 0,2 % erhöht.

Zur Reduktion evtl. vorhandener Disulfidbrücken, wurde TCP bis zu einer Endkonzentration von 2-4 mM zugegeben und der Ansatz wurde für 1 h 15 min bis 2 h bei 10°C ohne Belichtung inkubiert.

Die Reaktion der SH-Gruppen erfolgte während 2 h bei Raumtemperatur, nachdem die Blockierungssubstanz in der angegebenen Endkonzentration zugegeben wurde.

Bei einer Blockierung von freien Proteinen wurde die Blockierungsreaktion durch die Zugabe von 1 M β -Mercaptoethanol, gefolgt von einer 15 min Inkubation bei Raumtemperatur, beendet. Die Proteine wurden anschließend durch Aceton aus dem Reaktionsansatz ausgefällt und entweder in einer Gelelektrophorese aufgetrennt oder in eine nachfolgende Markierungsreaktion eingesetzt.

2.8.6.2 Reinigung der Bakteriophagen nach einer Blockierungsreaktion

Bei der Blockierung von Phagen-gebundenen Proteinen wurde auf die Zugabe von β -Mercaptoethanol zum Beenden der Blockierungsreaktion verzichtet. Die Bakteriophagen wurden in einer Airfuge durch einen Glyzeringradienten zentrifugiert.

Material:

- Glyzerin-Stufengradienten in Airfuge-Röhrchen (A110, Beckman Instruments GmbH, München):
45 μ l 40 % (v/v) Glyzerin in 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) überschichten mit
60 μ l 15 % oder 5 % (v/v) Glyzerin in 50 mM Tris-HCl (pH 7,8)

Durchführung:

Je 75 μ l Probe wurden auf die Glyzeringradienten aufgetragen.

Es wurde für 30 min bei 105000 rpm zentrifugiert (Airfuge, Rotor A110, Beckman Instruments GmbH, München).

Das Pellet wurde in 15 μ l 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) resuspendiert, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit weitem 56 μ l 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) versetzt. Die Probe wurde erneut auf einen Glyzeringradienten aufgetragen.

Nach 30 min bei 105000 rpm wurde das Pellet in 1 % SDS resuspendiert und in eine Markierungsreaktion eingesetzt.

2.8.6.3 Vollständige Markierung von SH-Gruppen

Im Gegensatz zu der Blockierung ist während der Markierungsreaktion das Vorliegen von Pigment-Protein-Komplexen unerwünscht. In diesem Fall sollte eine vollständige Markierung aller SH-Gruppen im Ansatz erreicht werden. Ausgangsmaterial war entweder eine Mischung von Lhcb1-Proteinen mit teilweise blockierten SH-Gruppen oder unbehandelte Lhcb1-Proteine bzw. Bakteriophagen.

Material:

- 1 % SDS
- 100 mM NaP-Puffer pH 7,5
- 10 % OG
- Biotin-BMCC-Stammlösung wie oben.

Durchführung:

Die Proteine bzw. die Bakteriophagen wurden zunächst in 1 % SDS aufgenommen, mit NaP-Puffer und OG versetzt, so dass sich folgende Endkonzentrationen ergaben:

- Proteinkonzentration bzw. Phagentiter wie angegeben.
- 0,2 % SDS
- 10 mM NaP-Puffer, pH 7,5
- 1 % OG

Durch Zugabe von 1-3 mM TCP und 1 h Inkubation bei 37°C wurden evtl. vorhandene Disulfidbrücken zwischen Cystein-Seitenketten reduziert.

Anschließend wurde Biotin-BMCC in der angegebenen Endkonzentration zugegeben und der Ansatz für 1,5 h bei 37°C inkubiert.

Die Markierungsreaktion wurde durch Zugabe von 0,45 bis 1 M β -Mercaptoethanol und einer anschließenden Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur beendet bzw. die Bakteriophagen wurden, wie oben beschrieben, durch Zentrifugation durch einen Glyzeringradienten aufgereinigt und in 20 μ l TBS, pH 7,2 (vgl. Kap. 2.9.1) resuspendiert.

2.9 Immobilisierung von Bakteriophagen

Während der Selektionsverfahren wurden die gewünschten Mutanten in Mikrotiterplatten immobilisiert. Dabei wurde entweder die Interaktion zwischen Biotin und NeutrAvidin, oder zwischen Antigen und Antikörper ausgenutzt.

2.9.1 Immobilisierung von Biotin-markierten Bakteriophagen in NeutrAvidin-beschichteten Mikrotiterplatten

Wie in Kap. 2.8.4.2 beschrieben, handelt es sich bei NeutrAvidin um ein Avidin-Derivat. Blockierte, NeutrAvidin-beschichtete Polystyrenplatten wurden von Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA) bezogen.

Material:

- Reacti-BindTM NeutrAvidinTM-beschichtete 96-Well-Polystyrenplatten: blockiert mit SuperBlock[®] Blockierungspuffer (Pierce, Rockford, IL, USA)
- TBS pH 7,2: 25 mM Tris-HCl (pH 7,2); 150 mM NaCl
- Waschpuffer: TBS pH 7,2; 0,1 % BSA; 0,05 % Tween 20
- Verdünnte Über-Nacht-Kultur von E. coli BLT5615: 2 ml Über-Nacht-Kultur; 6,6 ml M9LB-Medium (vgl. Kap. 2.5.3); 6,6 μ l Carbenicillin; 8,6 μ l 1 M IPTG

Durchführung:

Die NeutrAvidin-beschichtete Mikrotiterplatte wurde zunächst dreimal mit 200 μ l Waschpuffer gespült.

Die markierten, gereinigten Bakteriophagen (vgl. Kap. 2.8.6) wurden in Waschpuffer verdünnt. Pro Well wurden 100 µl Phagenlösung eingesetzt, die ungefähr 10^6 Bakteriophagen enthielten.

Die Platte wurde für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Immobilisierung wurde die Phagenlösung entfernt und die Platte wurde dreimal mit 200 µl Waschpuffer gespült.

Zur Elution wurden pro Well 200 µl verdünnte Über-Nacht-Kultur von *E. coli* BLT5615 zugegeben. Die Platte wurde bei 37°C inkubiert und die optische Dichte bei 600 nm wurde alle 2 min bestimmt (SpektraMax Plus, Molecular Devices, CA, USA). Dabei wurde die Platte vor jeder Messung für 10 sec geschüttelt.

2.9.2 Immunopräzipitation mit Lhcb1-Antikörpern

Eine Möglichkeit zur Immobilisierung der Lhcb1-Bakteriophagen mithilfe von Antikörpern ist die Immunopräzipitation. Dabei werden Bakteriophagen und Antikörper zunächst gemischt und anschließend auf eine Protein G-Platte gegeben. Protein G bindet an die konstanten Domänen von Antikörpern und sollte die Bakteriophagen-Antikörper-Komplexe auf diese Weise binden.

Material:

- Reacti-Bind™ Protein G-beschichtete 96-Well Platten: (Pierce, Rockford, IL, USA)
- IPT-Puffer: 0,1 M NaP-Puffer (pH 7,2); 0,15 M NaCl; 1 % Triton X-100; 0,1 % SDS
- Lhcb1-Antiserum: vgl. Kap. 2.8.4.1, Kaninchen SA7429
- Verdünnte Über-Nacht-Kultur von *E. coli* BLT5615: vgl. Kap. 2.9.1
- Elutionspuffer:

1	2	3
1 M NaCl	1 % SDS	1 mg/ml D7f.3
		0,1 % SDS
10 mM Tris-HCl (pH 7,8)		

Tab. 2.12: Elutionspuffer.

Durchführung:

90 µl IPT-Puffer mit ca. 2×10^{11} Bakteriophagen wurden mit 0,9 µl Lhcb1-Antiserum SA7429 versetzt und bei 4°C über Nacht inkubiert.

Die Proben wurden anschließend zweimal durch ein Glyzerinkissen (45 µl 40 % Glycerin; 50 mM Tris-HCl (pH 7,8)) zentrifugiert (vgl. Kap. 2.7.1). Das Pellet wurde in IPT-Puffer aufgenommen.

Die Protein G-Platte wurde zunächst 3x 5 min mit 200 µl IPT-Puffer pro Vertiefung gewaschen.

100 µl Probe pro Vertiefung wurden eingefüllt und die Platte wurde für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Immobilisierung wurden die Proben entfernt und die Platte wurde 5 x 5 min mit jeweils 200 µl IPT-Puffer pro Vertiefung gewaschen.

Anschließend wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte 3 x mit destilliertem Wasser gespült.

Zur Elution wurden 100 µl eines der drei Elutionspuffer in die Vertiefungen eingefüllt und die Platte wurde für 3 h bei 37°C inkubiert, oder es wurde eine Elution durch Lyse durchgeführt, wie in Kap. 2.9.1 beschrieben.

2.9.3 Affinitätsreinigung von Lhcb1-Antikörpern

Um die Effizienz der Immobilisierung von Lhcb1-Bakteriophagen zu erhöhen, wurden Lhcb1-Antikörper mithilfe einer Affinitätschromatographie aus dem Lhcb1-Antiserum isoliert und für die Beschichtung von Mikrotiterplatten eingesetzt.

Die Affinitätsreinigung wurde mithilfe einer Säule aus NHS-aktivierter Sepharose (HiTrap™ Pharmacia, Uppsala, Schweden) durchgeführt, die eine kovalente Kopplung von Proteinen über die primäre Aminogruppe erlaubt.

Lhcb1-Protein wurde kovalent an die Gelmatrix gebunden und diese Säule wurde zur Affinitätsaufreinigung der Antikörper aus dem Lhcb1-Antiserum SA7429 benutzt.

2.9.3.1 Herstellung der Affinitätssäule

Material:

- NHS-aktivierte Sepharosesäule (HiTrap™, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- D7f.3-Lösung: 1 mg/ml D7f.3 in 0,2 M NaHCO₃; 0,5 M NaCl; 0,1 % SDS; pH 8,3
- 1 mM HCl
- Puffer A: 0,5 M Ethanolamin; 0,5 M NaCl; pH 8
- Puffer B: 0,1 M Acetat; 0,5 M NaCl; pH 4
- TBS: 0,15 M NaCl; 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)

Durchführung:

Gemäß der Anleitung wurde die Säule am oberen Ende geöffnet und es wurden 10 µl 1 mM HCl (eiskalt) aufgetropft, bevor eine Spritze mit 1 mM HCl angeschlossen wurde.

Anschließend wurde der Verschluss am unteren Ende der Säule entfernt und die Säule wurde 3 x mit jeweils 2 ml 1 mM HCl gespült. Dabei sollte die Durchflussrate nicht über 1 ml/min liegen.

Nach dem Spülen der Säule mit 1 mM HCl wurde die Spritze mit 5 ml D7f.3-Lösung befüllt. Eine weitere Spritze wurde an das zweite Ende der Säule angeschlossen und die Lösung wurde für 30 min bei Raumtemperatur von Hand hin und her gepumpt.

Die Proteinkonzentration im Durchfluss war nach der Kopplung auf etwa ein Zehntel der Ausgangskonzentration gesunken. Die Kopplung wurde mit weiteren 5 ml Lösung wiederholt.

Durch die folgenden Waschschrte wurden ungebundene Proteine entfernt und überschüssige NHS-Gruppen abgesättigt:

3 x 5 ml Puffer A

3 x 5 ml Puffer B

3 x 5 ml Puffer A

30 min inkubieren

3 x 5 ml Puffer B

3 x 5 ml Puffer A
3 x 5 ml Puffer B
2 x 5 ml TBS

2.9.3.2 Reinigung der Lhcb1-Antikörper

Material:

- Antikörperlösung: Eine 1 : 10 Verdünnung des Lhcb1-Antiserums SA7429 in TBS wurde für 30 min bei 56°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und anschließend für 2 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, um das Komplementsystem zu deaktivieren.
- 0,5 M NaCl; 20 mM Tris-HCl (pH 7,5)
- 50 mM Tris-HCl (pH 8,8)
- 100 mM Ethanolamin, pH 11,7
- 1 M Tris-HCl (pH 7,5)
- 50 % Glyzerin in TBS
- Dialyseschlauch (12-14 kDa, Medicell International Ltd, London). Vor Verwendung autoklaviert in 10 mM Tris-HCl (pH 8); 50 mM EDTA

Durchführung:

Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Die Säule wurde zunächst ein weiteres Mal mit 5 ml TBS gespült.

Anschließend wurden 5 ml Antikörperlösung für 30 min von Hand in und her gepumpt.

Die Kopplung wurde mit weiteren 5 ml Antikörperlösung wiederholt.

Ungebundene Proteine wurden durch folgende Waschschrte entfernt:

2 x 5 ml TBS

2 x 5 ml 20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 500 mM NaCl

2 x 5 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8,8)

Die gebundenen Antikörper wurden mit Ethanolamin eluiert. Dazu wurden 5 ml 100 mM Ethanolamin auf die Säule gegeben.

20 Fraktionen à 500 µl wurden gesammelt und mit 50 µl 1 M Tris-HCl (pH 7,5) versetzt.

Die Absorption bei 280 nm der gesammelten Eluate wurde bestimmt. Die Antikörper schienen in drei Phasen eluiert zu werden. Aufeinanderfolgende proteinhaltige Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht bei 4°C gegen 50 % Glyzerin in TBS dialysiert.

Aus der Absorption bei 280 nm wurden die Antikörperkonzentrationen der Eluate bestimmt (Extinktionskoeffizient von IgGs bei 280 nm: 1,45 ml/mg). Aus 1 ml Antiserum konnten 140 µg Antikörper isoliert werden.

2.9.4 Immobilisierung von Bakteriophagen auf Lhcb1-Antikörper-beschichteten Mikrotiterplatten

Zur Immobilisierung der Lhcb1-Bakteriophagen wurden zunächst Mikrotiterplatten mit Anti-Lhcb1-Antikörper beschichtet. Dabei wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewandt, bei

denen die Antikörper in einem Fall aufgrund der Proteinbindenden Eigenschaften des Plattenmaterials, im anderen Fall durch direkte Bindung der konstanten Domäne an Protein G auf der Oberfläche der Mikrotiterplatten gebunden wurden.

1. Beschichtung von MaxiSorp 96-Well Immunoplaten oder Protein G-Platten mit Anti-Lhcb1-Antikörper

Material:

- MaxiSorp 96-Well Immunoplaten (Nunc, Wiesbaden)
- Reacti-Bind™ Protein G-beschichtete 96-Well Platten (Pierce, Rockford, IL, USA)
- TBST: 0,5 M NaCl; 20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 0,05 % Tween 20 bzw. 0,15 M NaCl; 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 0,05 % Tween 20
- Blockierungspuffer: 5 % BSA in TBST
- Affinitätsgereinigter Antikörper aus SA7429
- Elutionspuffer: 1 % SDS; 10 mM Tris-HCl (pH 7,8)

Durchführung:

Die Mikrotiterplatten wurden zunächst mit 200 µl TBST (NaCl-Konzentration wie angegeben) gewaschen. Anschließend wurde ca. 1 µg affinitätsgereinigter Antikörper in 100 µl Blockierungspuffer aufgetragen und die Platte wurde für 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt.

Anschließend wurde die Antikörperlösung entfernt und die Platte wurde erneut 3 x mit 200 µl TBST gewaschen.

2. Reinigung und Immobilisierung der Bakteriophagen

Material:

- 40 % Glycerin (v/v) in 50 mM Tris-HCl (pH 7,8)
- TBS: 0,5 M NaCl; 20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 0,05 % Tween 20 bzw. 0,15 M NaCl; 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 0,05 % Tween 20
- Waschpuffer: TBS mit 0,5 % Tween
- Elutionspuffer: 1 % SDS; 10 mM Tris-HCl (pH 7,8)
- Verdünnte Über-Nacht-Kultur von *E. coli* BLT5615, wie in Kap. 2.7.1 beschrieben.

Durchführung:

Wenn angegeben, wurden die Bakteriophagen vor der Immobilisierung durch Pelletierung gereinigt. Zunächst wurden die Proben (nach Rekonstitution und Trypsinverdau) für 2 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, um Pigment-Aggregate abzutrennen. Anschließend wurden ca. 50 µl Probe auf 45 µl 40 % Glycerin in 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) in Airfuge-Röhrchen (A110, Beckman Instruments GmbH, München) geschichtet. Die Proben wurden für 30 min bei 100000 rpm zentrifugiert. Das Phagen-Pellet wurde in 50 µl 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) aufgenommen und erneut wie oben durch ein Glycerinkissen zentrifugiert.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Bakteriophagen in TBS aufgenommen und mit 0,01 % SDS versetzt. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C, die eine vollständige Denaturierung gewährleisten sollte, wurden 100 µl der Bakteriophagensuspension mit ca. 10^{10} Bakteriophagen auf die Mikrotiterplatte aufgetragen und für 30 min bei Raumtemperatur geschwenkt.

Die Bakteriophagensuspension wurde entfernt und die Platte wurde 3 x mit Waschpuffer und 2 x mit destilliertem Wasser gewaschen.

Zur Elution der gebundenen Bakteriophagen wurde die Platte entweder mit 100 μl Elutionspuffer pro Vertiefung für 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt, oder es wurde eine *In situ*-Amplifikation durchgeführt, wie in Kap. 2.9.1 beschrieben.

2.10 Fluoreszenzspektroskopie

LHCIIb-Komplexe zeichnen sich dadurch aus, dass Chl *b* seine Anregungsenergie auf Chl *a* überträgt. Nach gezielter Anregung von Chl *b* bei einer Wellenlänge von 460-480 nm kann in intakten Komplexen eine Fluoreszenzemission von Chl *a*, mit einem Maximum bei 680 nm beobachtet werden. Chl *b* zeigt eine maximale Fluoreszenzemission bei 660 nm und das Verhältnis der Fluoreszenz bei 680 und bei 660 nm erlaubt Rückschlüsse darauf, welcher Anteil der Chl *b*-Moleküle in Pigment-Proteinkomplexen, und welcher Anteil ungebunden vorliegt.

Fluoreszenzspektroskopische Messungen wurden mit zwei verschiedenen Intentionen durchgeführt: Anhand der Fluoreszenzemissionsspektren nach einer Anregung von Chl *b* wurde die Rekonstitutionsfähigkeit von verschiedenen Lhcb1-Mutanten verglichen. In einer kinetischen Messung wurde der Rückgang des Energietransfers und damit der Komplexzerfall bei erhöhter Temperatur bzw. in der Gegenwart von denaturierenden Agenzien beobachtet. Aus den kinetischen Kurven wurde die mittlere Lebensdauer der Komplexe bestimmt und zum Vergleich der Stabilitäten der Pigment-Protein-Komplexe verschiedener Lhcb1-Mutanten herangezogen.

Geräte:

- Fluoreszenzspektrometer: FluoroMax-2 und FluoroMax-3, Jobin Yvon Spex Instruments S.A. Inc., Frankreich (Software: Datamax Version 2.24/Grams 32)
- Digitalthermostat: Ministat Compatible Control, Huber Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg-Elgersweiler

2.10.1 Aufnahme von Fluoreszenzspektren

2.10.1.1 „Front-Face“-Messung unverdünnter Rekonstitutionsansätze

In einigen Experimenten wurde die Fluoreszenzspektroskopische Messung unmittelbar nach der Rekonstitution durchgeführt. Dabei wurden die Pigment-Protein-Komplexe durch eine SDS-Verdünnung rekonstituiert, wobei 1,6 x mehr Chlorophyllmoleküle vorlagen als Pigment-Bindestellen an Proteinen im Rekonstitutionsansatz vorhanden waren.

Die Chlorophyll-Endkonzentration lag bei 0,11 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, einer Konzentration bei der eine Messung der Fluoreszenz in klassischer Versuchsanordnung, mit einem Winkel von 90° zwischen Anregungslicht und Detektor, von Fehlern durch Beschattungseffekte und Reabsorption behaftet wäre. Diese Messungen wurden daher in einer so genannten „Front-Face“-Anordnung durchgeführt, bei der das emittierte Licht in einem 45° Winkel zum Anregungslichtstrahl gesammelt und über Spiegel auf den Photomultiplier gelenkt wird.

Messparameter:

- Fluoreszenzküvette mit 0,5 cm Kantenlänge
- Anregungswellenlänge: 470 nm (wenn nicht anders angegeben)
- Spaltbreite des Anregungslichtes: 3 nm

- Spaltbreite des emittierten Lichtes: 3 nm
- Increment: 1 nm
- Integrationszeit: 0,1 sec

Das aufgenommene Emissionsspektrum wurde durch das Spektrum des Anregungslichtes dividiert (Signal: S/R).

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Fluoreszenzemissionsspektren bei Raumtemperatur aufgenommen.

2.10.1.2 90°-Winkel-Messung verdünnter Rekonstitutionsansätze

Verdünnte Proben mit Absorptionen von unter 0,1 (Schichtdicke 0,5 cm) bei der Anregungswellenlänge, wurden in einer konventionellen Versuchsanordnung gemessen, in der die Fluoreszenz in einem Winkel von 90° zum Anregungslichtstrahl aufgenommen wird.

Messparameter:

- Fluoreszenzküvette mit 0,5 cm Kantenlänge
- Anregungswellenlänge: 470 nm (wenn nicht anders angegeben)
- Spaltbreite des Anregungslichtes: 1 nm
- Spaltbreite des emittierten Lichtes: 5 nm
- Increment: 1 nm
- Integrationszeit: 0,01 sec

Das aufgenommene Emissionsspektrum wurde durch das Spektrum des Anregungslichtes dividiert (Signal: S/R).

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Fluoreszenzemissionsspektren bei Raumtemperatur aufgenommen.

2.10.2 Fluoreszenzkinetik bei 37°C

Die Dissoziation der Pigment-Protein-Komplexe bei 37°C wurde anhand des Rückganges des Komplex-internen Energietransfers beobachtet. Wie in Yang et al., 1999 beschrieben, wurden die Rekonstitutionsansätze nach einer Detergenswechselrekonstitution in eiskaltem Puffer verdünnt und in die vorgewärmte Küvette eingefüllt. Die Messung wurde sofort nach Einfüllen der Probe gestartet. Die Temperatur der Probe erreichte nach ca. 150 sec einen konstanten Wert von etwa 35°C.

Material:

- Verdünnungspuffer: 100 mM Tris-HCl (pH 7); 10 % Glyzerin; 1 % OG

Durchführung:

Nach einer Detergenswechselrekonstitution wurden die Proben zunächst für 20 min bei 20000 g, 4°C zentrifugiert. Je 10 µl der Überstände wurden unter Mischen zu 590 µl des eiskalten Verdünnungspuffers gegeben. Die verdünnten Proben wurden für 2-5 min auf Eis inkubiert und anschließend in die vorgewärmte Küvette (37°C) eingefüllt.

Messparameter:

- Fluoreszenzküvette mit 0,5 cm Kantenlänge
- Anregungswellenlänge: 470 nm (wenn nicht anders angegeben)

- Emissionswellenlängen: 660 und 680 nm
- Spaltbreite des Anregungslichtes: 1 nm
- Spaltbreite des emittierten Lichtes: 5 nm
- Increment: 1 sec
- Integrationszeit: 0,01 sec

Die Signale wurden durch die Intensität des Anregungslichtes dividiert (Signal: S/R).

Die Auswertung der kinetischen Kurven erfolgte wie angegeben mithilfe der Software Table Curve 2D (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

2.11 FACS – Fluorescence Activated Cell Sorting

Fluorescence Activated Cell Sorting oder Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, dass zur Sortierung von Zellen mit bestimmtem Fluoreszenzverhalten herangezogen werden kann. In Zusammenarbeit mit Dr. S. Schmitt (FACS Core Facility der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) wurde getestet, ob mithilfe der Durchflusszytometrie eine Sortierung von Pigment-bindenden und nicht-Pigment-bindenden Bakteriophagen möglich ist.

Durchführung:

1. Reinigung der Bakteriophagen nach der SDS-Verdünnungsrekonstitution

30 µl Probe wurden mit 60 µl Rekonstitutionspuffer (100 mM NaP (pH 7,5); 12,5 % Saccharose) mit 0,2 % SDS und 1 % OG versetzt.

Die verdünnte Probe wurde auf 45 µl 40 % Glycerin; 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) in Airfuge-Röhrchen (A110, Beckman Instruments GmbH, München) geschichtet.

Es wurde für 30 min bei 100000 rpm zentrifugiert (Airfuge, Rotor A110, Beckman Instruments GmbH, München).

Die pelletierten Bakteriophagen wurden wie beschrieben aufgenommen und gegebenenfalls ein zweites Mal pelletiert.

Das Bakteriophagenpellet wurde in PBS (35,85 mM K₂HPO₄; 14,15 mM KH₂PO₄; 146,6 mM NaCl; pH 7,2) mit 0,1 % LM aufgenommen, die Bakteriophagenkonzentration lag bei ca. 5×10^{11} pfu/ml.

Die Messungen wurden mithilfe des BD FACS Calibur Systems (BD Biosciences, Heidelberg) durchgeführt. Die Anregung erfolgte mit Licht der Wellenlänge 488 nm.

Zunächst wurde anhand der Autofluoreszenz des Puffers bei 610 nm (PBS mit 0,1 % LM) ein Schwellenwert definiert. Proben-Partikel mit Fluoreszenzen über diesem Schwellenwert wurden anschließend aufgrund ihrer Lichtstreuenden Eigenschaften charakterisiert. Dazu wurde zum einen die Lichtbeugung (forward scatter) und zum anderen die Lichtstreuung (side scatter) herangezogen. Die Fluoreszenz und die Anzahl von Partikeln mit ähnlichen Lichtstreuenden/Lichtbeugenden Eigenschaften für T7 Lhcb1-Bakteriophagen und T7 WT-Bakteriophagen wurde verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Möglichkeiten zur Selektion stabiler LHCIIB-Mutanten

Technische Anwendungen des LHCIIB in der Photovoltaik stellen hohe Ansprüche an die Stabilität des Pigment-Protein-Komplexes. Ziel der folgenden Experimente war, eine Stabilisierung des LHCIIB durch Aminosäure-Austausche zu erreichen. Da die vorliegenden Informationen über die Architektur von Membranproteinen im Allgemeinen und über die des LHCIIB im Besonderen wenig Anhaltspunkte für konkrete stabilisierende Austausche liefern, wurde ein evolutives Verfahren gewählt. Aus einer Anzahl von Lhcb1-Proteinen mit zufälligen Aminosäureaustauschen sollten diejenigen selektiert werden, die stabilere Pigment-Protein-Komplexe bilden. Durch Kombination mehrerer stabilisierender Austausche könnte möglicherweise eine signifikante Verbesserung der Stabilität erreicht werden.

Ein Selektionsverfahren sollte im Gegensatz zu einer systematischen Durchmusterung einer Mutantenbibliothek gezielt diejenigen Mutanten, die sich durch eine erhöhte Stabilität auszeichnen, heraus greifen. Ein entsprechendes Selektionsverfahren könnte auch zur Selektion von LHCIIB-Mutanten mit veränderten Pigment-Bindungseigenschaften oder bestimmten Bindungsaffinitäten eingesetzt werden.

In den folgenden Experimenten wurden verschiedene Möglichkeiten zur Selektion stabilerer Pigment-Protein-Komplexe getestet, und ein Verfahren entwickelt, das eine solche Selektion erlauben sollte. Dieses Verfahren wurde in Kapitel 3.2 zur Selektion von Mutanten-Bibliotheken herangezogen.

3.1.1 Expression des Lhcb1 als Phage Display

Eine spezielle Expressionsmethode für eine *In vitro*-Evolution ist ein „Phage Display“, das eine parallele Selektion auf Protein- und DNA-Ebene ermöglicht. Die Proteine werden dabei als Fusion an ein Protein des Phagen-Capsids exprimiert. Das Capsid-gebundene Fremdprotein ragt in das umgebende Medium und ist dort für weitere Untersuchungen zugänglich.

Die Expression des Lhcb1 als Phage Display gelang mithilfe des Vektors T7 Select (Novagen, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.). Dazu wurde die Lhcb1-cDNA in das Phagen-genom ligiert und anschließend *in vitro* in Capside verpackt. Die entstanden Phagen Partikel infizieren Wirtszellen, in denen dann Fusionsproteine aus dem majoren Hüllprotein (p10) und Lhcb1 produziert werden, wobei der N-Terminus des Lhcb1 mit dem C-Terminus des p10 fusioniert vorliegt. Diese Fusionsproteine werden zum Aufbau der Bakteriophagen-Capside verwendet. Da die Phagenhülle bei einem Fremdprotein dieser Größe nicht ausschließlich aus Fusionsproteinen aufgebaut werden kann, muss zusätzlich unfusioniertes p10 exprimiert werden, das auf einem Plasmid in der Wirtszelle codiert wird. Nach Hersteller-Angaben ist mit 5-15 Kopien des Fremdproteins pro Capsid zu rechnen. In Western Blots der Proteine denaturierter Phagenpartikel waren p10-Lhcb1-Fusionsproteine in erwarteter Menge nachweisbar (vgl. Abb. 3.16). Die Lhcb1-Proteine auf der Phagenhülle konnten auch direkt in den Bakteriophagen-Plaques mithilfe von Antikörpern nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.17).

Die Lhcb1-Proteine wurden dann auf dem Bakteriophagencapsid mit Pigmenten rekonstituiert, wobei ein Nachweis der Rekonstitution durch gängige Methoden, wie z. B. Messung des Energietransfers, nicht möglich war, da keine ausreichend hohen Lhcb1-Konzentrationen erreicht werden konnten. Wie in Kap. 3.1.2.4 beschrieben, gelang der Nachweis der Rekonstitution schließlich über die Trypsin-Resistenz rekonstituierter Komplexe.

In einer so genannten „Biopanning“-Prozedur sollte eine spezifische Sortierung stabiler LHCIIB-Mutanten erreicht werden. Die folgenden Kapitel beschäftigen sich mit der Frage, wie eine solche spezifische Sortierung aussehen könnte.

3.1.2 Spezifische Sortierung stabiler LHCIIB-Mutanten

Stabile LHCIIB-Mutanten sollten sich von instabilen insofern unterscheiden, als sie unter bestimmten stringenten Bedingungen noch als Pigment-Protein-Komplexe vorliegen, während die Pigment-Protein-Komplexe weniger stabiler Mutanten in Apoprotein und freie Pigmente zerfallen. Ist ein solcher Zustand erreicht, basiert die Selektion stabiler LHCIIB-Mutanten auf einer Trennung von rekonstituierten Komplexen und denaturierten Apoproteinen.

Verschiedene Eigenschaften der Pigment-Protein-Komplexe wurden als Selektionskriterien in Betracht gezogen und in den folgenden Kapiteln auf ihre Eignung hin überprüft. Drei der vier vorgestellten Methoden haben dabei indirekten Charakter und nutzen die unterschiedliche Markierbarkeit von Cysteingruppen und die unterschiedliche Proteaseresistenz rekonstituierter Proteine und Apoproteine.

3.1.2.1 Carboxypeptidase-Verdau

Um stabile LHCIIB-Mutanten zu selektieren, sollte die Tatsache genutzt werden, dass rekonstituierte Lhcb1-Proteine vor einem Abbau durch Proteasen geschützt sind, während das Apoprotein vollständig abgebaut wird. Rekonstituierte Lhcb1-Proteine sind jedoch nicht vollständig geschützt, ein N-terminaler Abschnitt von ca. 14 Aminosäuren wird z.B. durch die Protease Trypsin abgebaut (Paulsen et al., 1993). Da die Lhcb1-Mutanten über den N-Terminus an das Phagen-Hüllprotein fusioniert sind, würde eine proteolytische Spaltung in diesem Bereich zu einer Trennung des rekonstituierten Komplexes von der Phagenhülle führen (siehe auch Kap. 3.1.2.4).

Als mögliche Alternative wurden Carboxypeptidasen in Erwägung gezogen, die Polypeptidketten von ihrem C-terminalen Ende her durch Abspaltung einer Aminosäure nach der anderen abbauen. Zunächst wurde angestrebt, einen vollständigen Abbau der nicht rekonstituierten Lhcb1-Proteine zu erreichen. Nachdem sich das als schwierig erwies, wurden Lhcb1-Proteine mit einem C-terminalen His₆-Tag eingesetzt: Falls der His₆-Tag im rekonstituierten Komplex vor einem proteolytischen Abbau geschützt ist, im Apoprotein jedoch abgebaut wird, sollte es möglich sein, durch Bindung des His₆-Tag an Ni-NTA, eine Selektion stabiler Lhcb1-Mutanten zu erreichen (siehe Abb. 3.1).

Schutz eines C-terminalen His₆-Tag

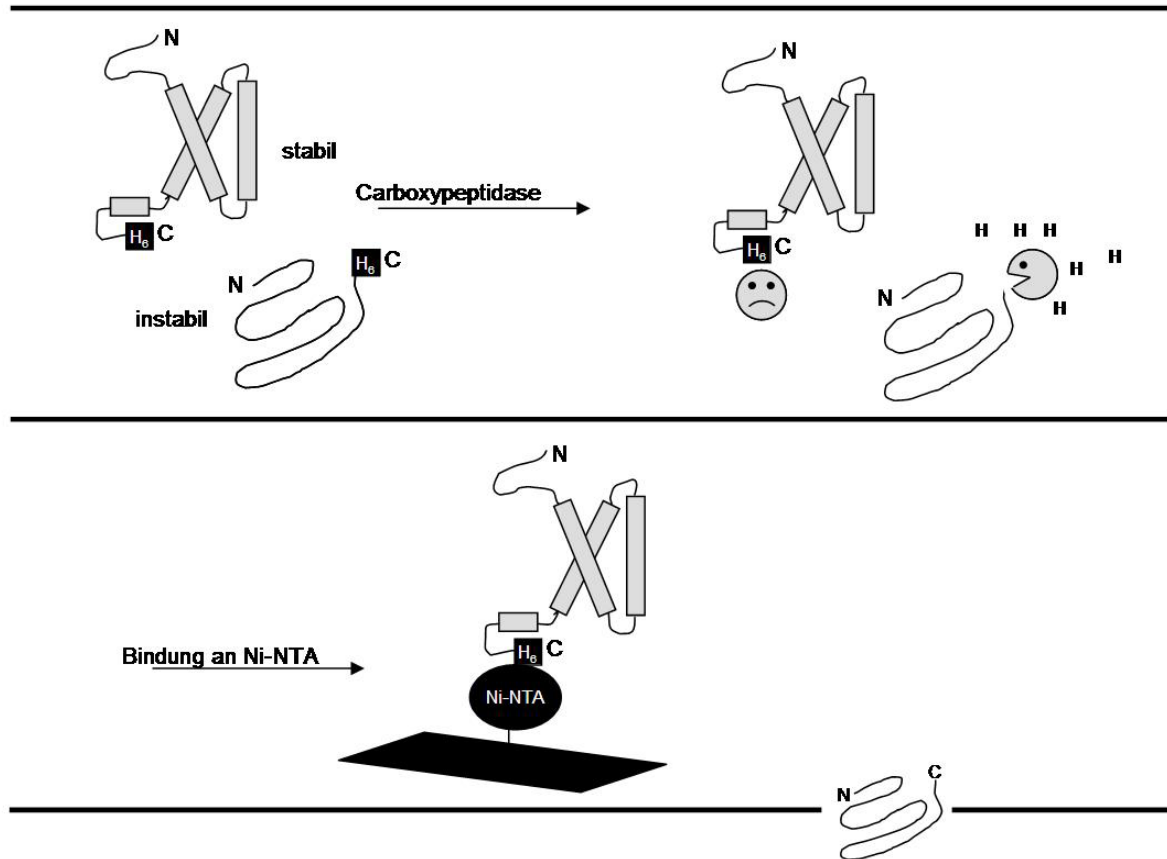


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der angestrebten Selektion stabiler LHCIIb-Mutanten durch Carboxypeptidaseverdau.

3.1.2.1.1 Carboxypeptidase A

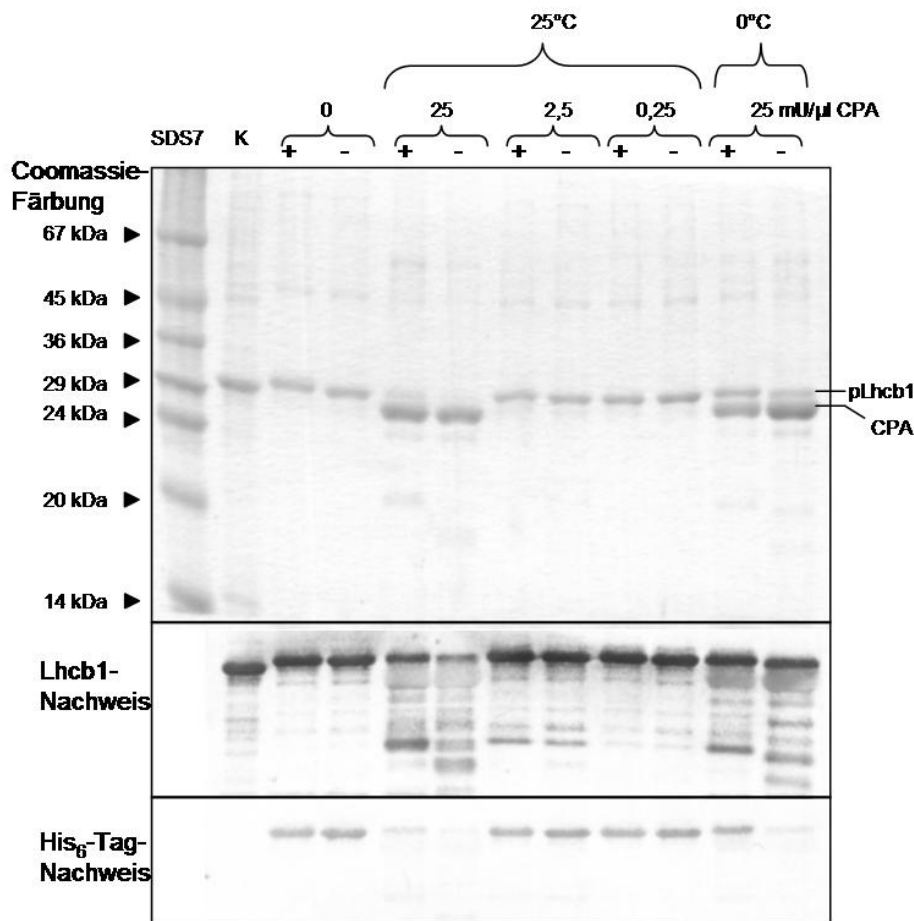


Abb. 3.2: Verdau mit Carboxypeptidase A unter verschiedenen Bedingungen.

C2.4h wurde durch Detergenswechsel rekonstituiert (Solubilisierungspuffer pH 8, mit 5 mM ϵ -Aminocaprinsäure und 1 mM Benzamidin; 1 mM DTT; 1 μ g/ μ l Chlorophyll; 0,4 μ g/ μ l Xanthophyll). Neben den mit + gekennzeichneten Rekonstitutionen wurden Detergenswechsel ohne Pigmente durchgeführt (-). Es wurde 30 min mit der angegebenen Menge an Carboxypeptidase A (CPA) und bei der angegebenen Temperatur verdaut (vgl. Kap. 2.8.5.1.1). Es wurden drei denaturierende PAA-Gele mit 0,9 μ g Protein pro Bahn beladen. Ein Gel wurde mit Coomassie gefärbt, die Proteine der anderen beiden Gele wurden auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Entsprechend der Bezeichnung wurden Lhcb1-Proteine mit Anti-Lhcb1-Antikörpern bzw. die His₆-Tags durch einen Anti-His-Antikörper nachgewiesen. K: 1 μ g 1n.1 als Kontrolle ohne His-Tag. M: SDS7-Molekulargewichtsmarker, die Molekulargewichte sind angegeben. CPA: Carboxypeptidase A.

Der Verdau durch Carboxypeptidase A (CPA) aus Rinderpancreas entsprach in vielerlei Hinsicht nicht den Erwartungen. Zum einen waren sowohl im Coomassie-gefärbten Gel als auch nach einem Nachweis mit Anti-Lhcb1-Antikörpern mehrere Abbauprodukte zu sehen, die zum Teil auch durch den Anti-His-Antikörper gebunden wurden (Abb. 3.2, His₆-Tag-Nachweis). Der Anti-His-Antikörper bindet sehr spezifisch an den His₆-Tag, das Kontrollprotein 1n.1, ein pLhcb1-Protein ohne His-Tag, zeigte kein Signal. Bei einer ausschließlichen Carboxypeptidase-Aktivität würde man keine distinkten Abbauprodukte erwarten und sicherlich keine verkürzten Produkte, in denen der C-terminale His-Tag noch nachweisbar ist. Carboxypeptidase A kann nach Angaben des Herstellers durch Trypsin und Chymotrypsin verunreinigt sein. Ein Verdau in Gegenwart der Trypsin-/Chymotrypsin-Inhibitoren TLCK und TPCK konnte das Auftreten von Degradationsprodukten mit His-Tag jedoch nicht verhindern (nicht gezeigt).

Trotz der Unstimmigkeiten ergab sich in Abb. 3.2 nach 30 min Verdau auf Eis, in Gegenwart von 25 mU CPA pro μl Ansatz, das erhoffte Bild: Die rekonstituierte Probe zeigte ein deutlich stärkeres His-Tag-Signal als die Kontrolle ohne Pigment, was auf einen Schutz des His-Tag durch die Rekonstitution hindeutete. Durch die gleiche Enzymmenge wurde bei 25°C auch der His-Tag in der rekonstituierten Probe fast vollständig abgebaut, während bei geringeren Konzentrationen in keiner der beiden Proben ein Abbau des His-Tags beobachtet werden konnte.

Leider konnte das positive Ergebnis eines Carboxypeptidase-Verdaus auf Eis nicht reproduziert werden. In den folgenden Versuchen konnte auch nach zweistündiger Inkubation der nicht-rekonstituierten Proben auf Eis kein entsprechender Abbau des His-Tag beobachtet werden und es ergaben sich keine Hinweise auf einen Schutz des C-terminalen His-Tag im rekonstituierten Komplex (nicht gezeigt).

Es wurde auch versucht, den His-Tag durch Zugabe von NiCl_2 vor der Protease zu schützen. In diesen Ansätzen wurde 0,1 mM NiCl_2 direkt in den Rekonstitutionsansatz gegeben. Auf DTT wurde in diesen Fällen verzichtet. Das NiCl_2 verhinderte nicht, wie erwartet, den Abbau des His-Tag, im Gegenteil konnte in den Ansätzen mit NiCl_2 sogar ein verstärkter Abbau beobachtet werden (nicht gezeigt).

Nach diesen Ergebnissen schien Carboxypeptidase A nicht geeignet, um eine Selektion stabiler LHCIIB-Mutanten zu erreichen.

3.1.2.1.2 Carboxypeptidase P und Y

Weder mit Carboxypeptidase P aus *Penicillium janthinellum* noch mit Carboxypeptidase Y aus *Saccharomyces cerevisiae* konnte ein spezifischer Abbau des C-terminalen His-Tags in nicht-rekonstituierten Lhcb1-Proteinen erreicht werden. Die Anwesenheit von Benzamidin und ϵ -Aminocaprinsäure, sowie DTT, schienen den Abbau zu hemmen. Verzicht auf diese Substanzen führte jedoch sowohl in der rekonstituierten als auch in der nicht-rekonstituierten Probe zu einem Rückgang des His-Tag-Signals. Wie auch bei Carboxypeptidase A, konnte das Auftreten von Degradationsprodukten mit His-Tag beobachtet werden, die sich nur durch eine Endopeptidase-Aktivität erklären ließen.

Nachdem mit keiner der drei Carboxypeptidasen der gewünschte spezifische Abbau des His₆-Tag rekonstituierter Lhcb1-Proteine erreicht werden konnte, wurde die Idee einer Selektion stabiler LHCIIB-Mutanten durch Carboxypeptidase-Verdau nicht weiter verfolgt.

3.1.2.2 Cysteinmarkierung mit Biotinmaleimid

Lhcb1-Proteine aus *Pisum sativum* enthalten ein einziges Cystein in Position 79 (Zählung nach Kühlbrandt et al., 1994), dessen Sulfhydrylgruppe im Apoprotein mit z. B. Maleimiden reagieren kann, im rekonstituierten Komplex dagegen für diese chemische Reaktion weniger zugänglich sein sollte.

Falls diese Spezifität der Cysteinmarkierung tatsächlich gegeben ist, wie durch die folgenden Experimente überprüft wurde, dann könnte diese Tatsache genutzt werden, um in einer zweistufigen Prozedur eine Markierung der stabilen LHCIIB-Mutanten zu erreichen.

Ausgehend von einer Situation, in der lediglich die stabilen LHCIIB-Mutanten als Pigment-Protein-Komplexe vorliegen, könnten alle zugänglichen SH-Gruppen, das heißt alle SH-Gruppen der entfalteten Proteine, durch eine beliebige SH-reaktive Substanz blockiert werden. Nach Denaturierung der Pigment-Protein-Komplexe könnten in einem zweiten Markierungsschritt die verbleibenden SH-Gruppen der stabilen Mutanten mit Biotinmaleimid markiert werden (vgl. schematische Darstellung in Abb. 3.3).

Markierbarkeit der SH-Gruppe

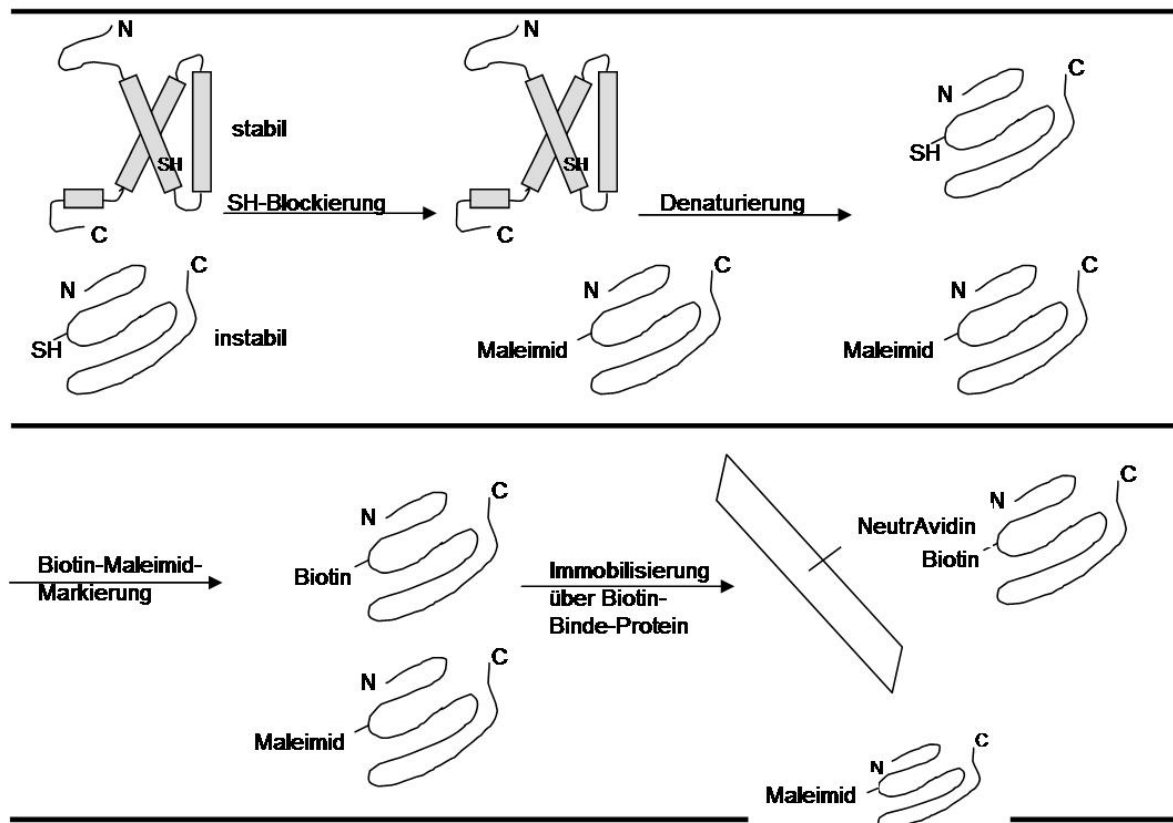


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der spezifischen Biotin-Markierung rekonstituierter Komplexe.

3.1.2.2.1 Blockierbarkeit der SH-Gruppe in Komplex und Apoprotein – Abhängigkeit von der Aminosäureposition

Die spezifische Markierung stabiler LHCIIb-Mutanten setzt eine veränderte Reaktivität der SH-Gruppe eines Lhcb1-Proteins im Komplex und als Apoprotein voraus. Die Zugänglichkeit der SH-Gruppe im Apoprotein sollte möglichst hoch sein, die SH-Gruppe im Komplex sollte dagegen für eine Reaktion nicht zugänglich sein.

Da uns Lhcb1-Mutanten mit singulären Cysteinen in unterschiedlichen Domänen des Komplexes zur Verfügung stehen (C. Huschenbett, S. Storf), wurden diese bezüglich der Blockierbarkeit ihrer SH-Gruppe überprüft. Zur Blockierung wurde in diesem Fall Rhodamin-Maleimid benutzt, das zum einen durch seine Fluoreszenz zu detektieren ist, zum anderen aber auch einen Laufunterschied der Proteine in einer denaturierenden SDS-Gelelektrophorese verursacht.

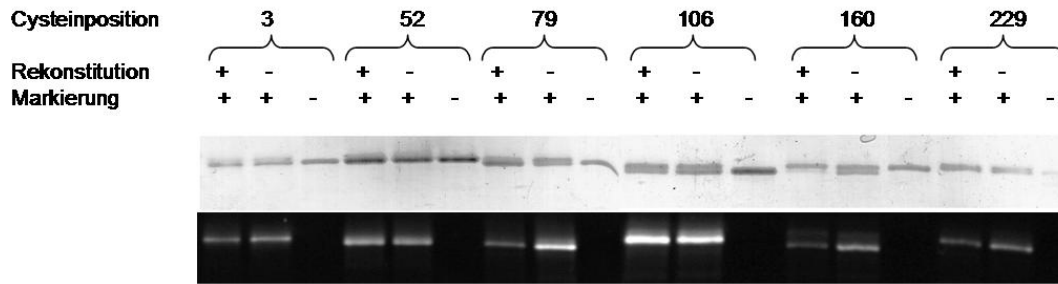


Abb. 3.4: Blockierbarkeit der SH-Gruppen in Komplex und Apoprotein in Abhängigkeit von der Aminosäureposition.

Lhcb1-Proteine mit Cysteinen an verschiedenen Stellen der Aminosäuresequenz wurden bezüglich ihrer Markierbarkeit als Apoprotein und im Komplex verglichen. Dazu wurden die Komplexe durch SDS-Verdünnung (Puffer: 100 mM Na-P, pH 7,5; 12,5 % Saccharose; ohne DTT) rekonstituiert. Bei den mit „Rekonstitution +“ gekennzeichneten Proben wurde mit 1 µg/µl Chlorophyll und 0,4 µg/µl Xanthophyll rekonstituiert, während in den „Rekonstitution –“ –Proben die Rekonstitutionsprozedur ohne Pigmente durchgeführt wurde. Die Blockierung wurde durchgeführt wie in Kap. 2.8.6.1 beschrieben. Rhodamin-Maleimid-Konzentration: 0,67 mM. Die Proteine wurden anschließend durch Aceton gefällt und in einer denaturierenden PAGE aufgetrennt. Die Fluoreszenz wurde in einer Geldokumentationsanlage aufgenommen (unterer Bildteil). Anschließend wurden die Gele mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt (oberer Bildteil).

In Abb. 3.4 zeigten sich deutliche Unterschiede der Markierbarkeit der Komplexe und, überraschenderweise, auch in der Markierbarkeit der Apoproteine. Das Cystein in Position 106 (luminale Schleife) zeigte die stärkste Reaktion mit Rhodamin-Maleimid, ließ allerdings keinen Unterschied in der Zugänglichkeit des Apoproteins und des Pigment-Protein-Komplexes erkennen.

In den Positionen 3 (N-Terminus), 52 (vor der ersten Transmembranhelix) und 229 (C-Terminus) war die Markierbarkeit deutlich schlechter, Unterschiede in der Markierbarkeit von Komplex und Apoprotein wurden in diesen Fällen nicht beobachtet.

Ein Cystein in Position 160 (stromale Schleife) war im entfaltenen Protein besser zugänglich als im Komplex, am besten schien jedoch das Lhcb1-Wildtyp-Protein mit einem Cystein an Position 79 (in der ersten Transmembranhelix) geeignet. Hier konnte man sowohl eine gute Blockierbarkeit des Apoproteins als auch eine stark eingeschränkte Zugänglichkeit des Cysteins im Komplex beobachten.

3.1.2.2.2 Vergleich verschiedener Blockierungsreagenzien

Nachdem die selektive Blockierbarkeit des Apoproteins gezeigt werden konnte, sollten verschiedene SH-Gruppen-reaktive Blockierungsreagenzien bezüglich ihrer Selektivität für entfaltete Proteine und der Vollständigkeit der Reaktion überprüft werden. Die Güte der Blockierung wurde anhand der Effizienz einer nachfolgenden Markierung mit Biotin-BMCC verglichen. Biotin-BMCC ist mithilfe der Biotin-bindenden Proteine Avidin, Streptavidin oder Neutravidin nachweisbar, verursacht aber auch ein anderes Laufverhalten der Proteine während einer elektrophoretischen Auftrennung.

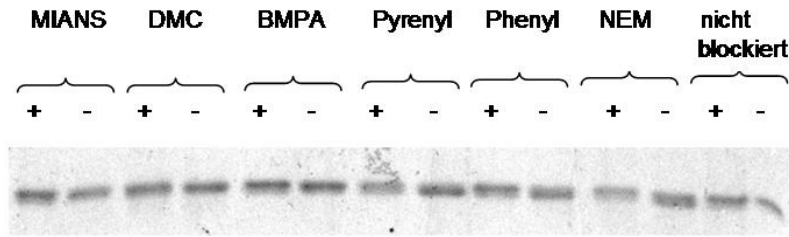


Abb. 3.5: Vergleich verschiedener Blockierungsreagenzien.

Wildtyp-Lhcb1 (D7f.3) wurde durch SDS-Verdünnung wie in Abb. 3.4 rekonstituiert. +: Rekonstitution mit Pigmenten. -: Durchführung der Rekonstitutionsprozedur ohne Pigmente. Die Blockierungsreaktion wurde durchgeführt wie in Kap. 2.8.6.1 beschrieben. Konzentration der Blockierungssubstanzen: 0,3 mM. Nach der Blockierung wurden die Proteine durch Aceton gefällt, getrocknet und in 1 % SDS resuspendiert. Die Markierung der verbliebenen Cysteingruppen mit Biotin-BMCC erfolgte wie in Kap. 2.8.6.3 beschrieben. Proteinkonzentration: 12,5 ng/µl. Biotin-BMCC-Konzentration: 68 µM. Anschließend wurden die Proteine durch Aceton gefällt und in einer denaturierenden PAGE aufgetrennt. Pro Bahn wurden ca. 0,5 µg Protein aufgetragen. Die Proteine wurden durch Coomassie-Blau angefärbt. MIANS: 2-(4'-maleimidylanilino)naphthalene-6-Sulfonic acid Sodium salt (MW 416,38); DMC: 7-Diethylamino-3-(4'-maleimidylphneyl)-4-methylcoumarin (MW 402,45); BMPA: N-β-Maleimidopropionic acid (MW 169,13); Pyrenyl: N-(1-Pyrenyl)maleimid (MW 297,3); Phenyl: N-Phenylmaleimid (MW 173,17); NEM: N-Ethylmaleimid. M: SDS7-Molekulargewichtsmarker, die Molekulargewichte sind angegeben.

Nach Coomassie-Färbung zeigten sich in einigen Fällen (Pyrenyl-Maleimid; Phenylmaleimid und N-Ethylmaleimid) Doppelbanden, wobei in den nicht-rekonstituierten Proben die untere Bande stärker war als die obere. Die Bindung von Biotin-BMCC führt zu einer Verlangsamung der Proteine während der elektrophoretischen Auftrennung, die Bindung der Blockierungssubstanzen, hatte dagegen keinen deutlichen Einfluss auf das Laufverhalten (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieses bekannten Laufverhaltens wird davon ausgegangen, dass im Falle der Doppelbanden die obere Bande das Biotin-markierte Protein enthält, während sich das unmarkierte Protein in der unteren Bande befindet.

Die erwähnten Blockierungssubstanzen reduzierten damit die Biotin-Markierbarkeit der unrekonstituierten Proteine. Allerdings schien weder die Blockierungs- noch die Markierungsreaktion vollständig abzulaufen.

3.1.2.2.3 Blockierung mit Jodacetamid

Im Gegensatz zu den bisher erwähnten Blockierungssubstanzen, die schlecht wasserlöslich sind, hatte Jodacetamid den Vorteil, aufgrund seiner guten Wasserlöslichkeit in deutlich höheren Konzentrationen eingesetzt werden zu können. Abb. 3.6 zeigt die Blockierungseffizienz verschiedener Jodacetamid-Konzentrationen.

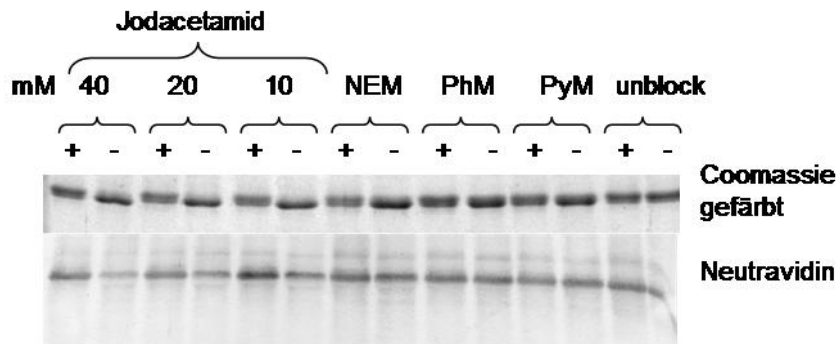


Abb. 3.6: Blockierung mit Jodacetamid.

Wildtyp-Lhcb1 (D7f.3) wurde wie in Abb. 3.5 durch SDS-Verdünnung rekonstituiert, blockiert und mit Biotin-BMCC markiert. +: Rekonstitution mit Pigmenten. -: Durchführung der Rekonstitutionsprozedur ohne Pigmente. Konzentrationen der Blockierungssubstanzen wie angegeben bzw. 0,3 mM. Nach Beenden der Markierungsreaktion wurden die Proteine durch Aceton gefällt, in Sparmix aufgenommen und in einer denaturierenden PAGE aufgetrennt. Pro Bahn wurden ca. 2 µg Protein aufgetragen. Eines der Gele wurde mit Coomassie gefärbt, die Proteine eines zweiten Gels wurden auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen, wo die Biotinmarkierten Proteine durch Neutravidin-AP nachgewiesen wurden konnten (Substrat: NBT/BCIP). NEM: N-Ethylmaleimid; PhM: N-Phenylmaleimid (MW 173,17); PyM: N-(1-Pyrenyl)maleimid (MW 297,3); unblock: unblockierte Kontrolle.

Wie das Auftreten einer Doppelbande nach einer Markierung der unblockierten Probe mit Biotin-BMCC zeigte, konnte in diesem Fall keine vollständige Biotin-BMCC-Markierung erreicht werden. Nach einer Blockierung mit Jodacetamid in verschiedenen Konzentrationen traten lediglich in den rekonstituierten Proben Doppelbanden auf, während die obere, Biotin-BMCC-markierte, Bande in den nicht-rekonstituierten Proben fehlte. Nach einer Blockierung mit N-Ethylmaleimid, Phenylmaleimid oder Pyrenylmaleimid konnte auch in der nicht-rekonstituierten Probe eine Doppelbande beobachtet werden, wobei die untere, unmarkierte, Bande in diesen Proben deutlich stärker war als in den rekonstituierten Proben. Die Blockierung durch Jodacetamid erschien daher deutlich effizienter als eine Blockierung durch N-Ethylmaleimid, Phenylmaleimid oder Pyrenylmaleimid, die wegen ihrer schlechten Wasserlöslichkeit allerdings auch in deutlich geringeren Konzentrationen (0,3 mM) eingesetzt werden mussten.

Ein Blockierungseffekt durch Jodacetamid konnte nicht nur durch den Laufunterschied von Biotin-BMCC-markiertem Protein im PAA-Gel, sondern auch durch einen Biotin-Nachweis mithilfe von Avidin-AP bestätigt werden. Die rekonstituierten Proben zeigten nach Jodacetamid-Blockierung ein deutlich stärkeres Biotin-Signal als die unrekonstituierten Proben.

3.1.2.2.4 Versuche zur Anwendbarkeit der SH-Gruppen-Markierung im Phage-Display-System

Mithilfe der gezeigten selektiven Biotin-Markierung rekonstituierter Komplexe (Abb. 3.6) sollte eine Anreicherung stabiler LHCIb-Mutanten möglich sein. In den folgenden Experimenten wurde versucht, eine spezifische Markierung von Bakteriophagen mit rekonstituierten Lhcb1-Proteinen zu erreichen.

Wegen der geringen Lhcb1-Konzentrationen und der schwachen Signale (Abb. 3.6) war ein direkter Nachweis Biotin-markierter Fusionsproteine nicht durchführbar. Der Nachweis einer spezifischen Markierung sollte daher durch die Immobilisierung Biotin-markierter Bakteriophagen auf Neutravidin-beschichteten Mikrotiterplatten erfolgen.

Zur Elution der immobilisierten Bakteriophagen wurden diese durch die Zugabe von Wirtszellen *in situ* amplifiziert. Dabei infizieren die gebundenen Bakteriophagen die

Wirtszellen und nach einem Generationszyklus erhält man identische Kopien der gebundenen Bakteriophagen im Überstand.

Es zeigte sich sehr bald, dass eine exklusive Bindung Biotin-markierter Bakteriophagen nicht zu erreichen war, und dass der Nachweis einer spezifischen Bindung nur über einen Vergleich der Anzahl immobilisierter Bakteriophagen in Biotin-markierten und unmarkierten Ansätzen erfolgen konnte.

Während der *in situ* Amplifikationen fiel auf, dass der Zeitpunkt der Zellyse, die als plötzlicher Rückgang der OD₆₀₀ im Photometer zu beobachten war, von der Anzahl der Bakteriophagen abhängig zu sein schien und zu einer Bestimmung der Anzahl der immobilisierten Bakteriophagen genutzt werden konnte.

3.1.2.2.4.1 Der Lyse-Zeitpunkt als Maß für die Anzahl immobilisierter Bakteriophagen

Zunächst wurden Wirtszellkulturen mit verschiedenen Mengen an „Phage-forming-units“ (pfu) versetzt. Anhand der optischen Dichte bei 600 nm wurden Wachstumskurven der Zellkulturen aufgenommen (Abb. 3.7). In einem Zeitraum von 150 min stieg die optische Dichte einer nicht-infizierten Zellkultur gleichmäßig an, während die infizierten Kulturen je nach Anzahl der Bakteriophagen zu unterschiedlichen Zeitpunkten einen Rückgang der optischen Dichte zeigten, der auf das Lysieren der Wirtszellen zurückzuführen war.

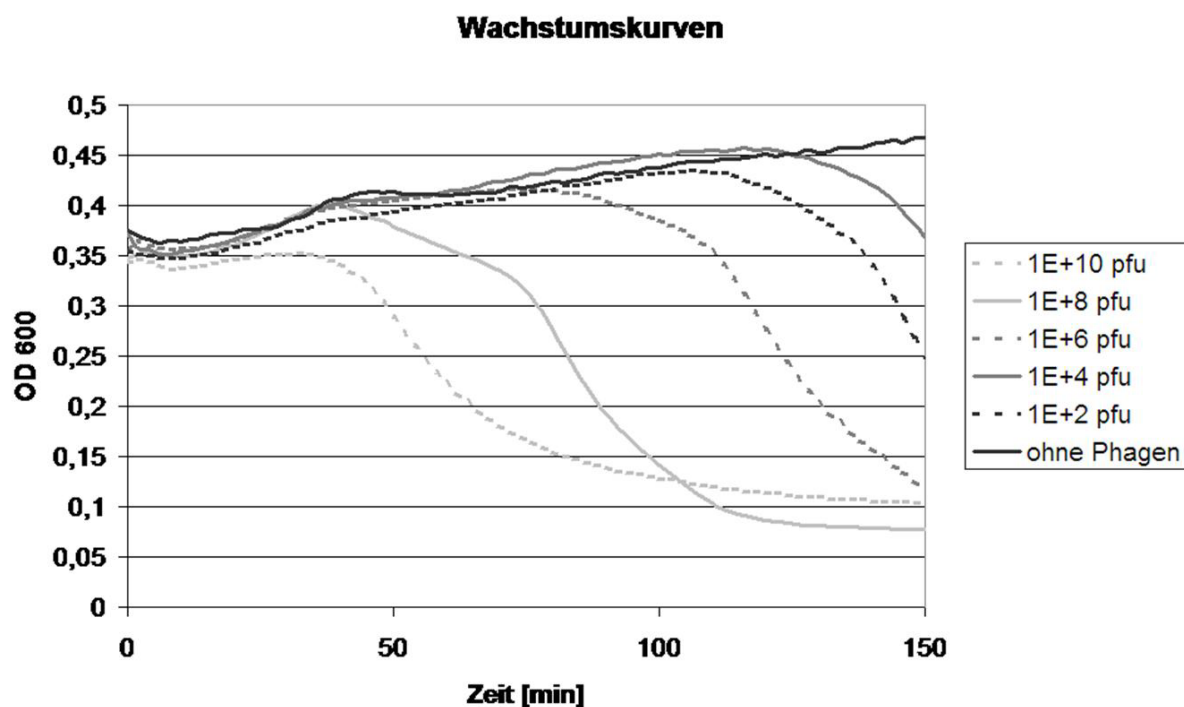


Abb. 3.7: Wachstumskurven von Wirtszellkulturen nach Infektion mit verschiedenen Mengen an Bakteriophagen.

Zu 200 µl *E. coli* BLT5615-Kultur (Übernacht-Kultur, 1 : 4 verdünnt in M9LB-Carbenicillin) in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden Bakteriophagen (T7 1n.1) in den angegebenen Mengen Phagenmengen zugegeben (pfu: Phage forming units). Über einen Zeitraum von 150 min wurde alle 2 min die OD₆₀₀ bestimmt. Das Photometer (SpectraMax Plus, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) wurde auf 37°C temperiert. Vor jeder Messung wurde die Mikrotiterplatte für 10 sec geschüttelt.

Der Zeitpunkt der maximalen optischen Dichte wurde als Lysezeitpunkt definiert. Abb. 3.8 zeigt eine Auftragung des Lysezeitpunktes in logarithmischer Abhängigkeit von der Phagenmenge.

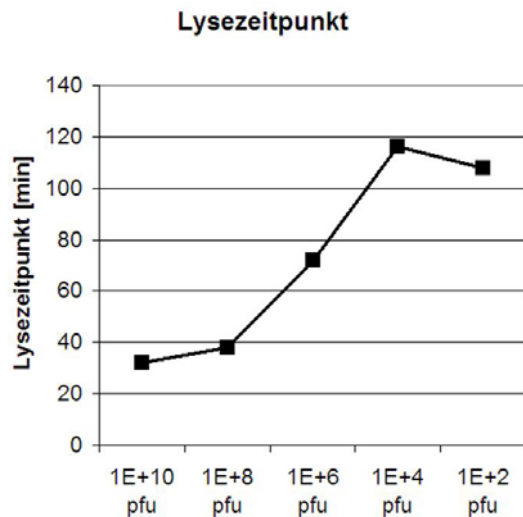


Abb. 3.8: Zusammenhang zwischen Lysezeitpunkt und Phagenanzahl.

Die maximale OD_{600} der Wachstumskurven in Abb. 3.7 wurde als Lysezeitpunkt in logarithmischer Abhängigkeit von der eingesetzten Phagenmenge aufgetragen. pfu: Phage forming units.

Der beste Zusammenhang zwischen der Anzahl der Bakteriophagen und dem Lysezeitpunkt scheint in einem Bereich zwischen 10^4 und 10^8 Bakteriophagen zu bestehen (Abb. 3.8). Um diesen Bereich besser aufzulösen, wurde ausgehend von einem Bakteriophagenlysate eine Verdünnungsreihe hergestellt, wobei die vorhergehende Verdünnung jeweils wieder um Faktor zwei verdünnt wurde. Phagenmengen zwischen 10^8 und 3×10^3 pfu wurden zu der Wirtskultur gegeben und die Wachstumskurven wurden, wie in Abb. 3.7 beschrieben, aufgenommen. Die Lysezeitpunkte wurden bestimmt und in Abb. 3.9 in Abhängigkeit vom Logarithmus der eingesetzten Phagenmenge dargestellt.

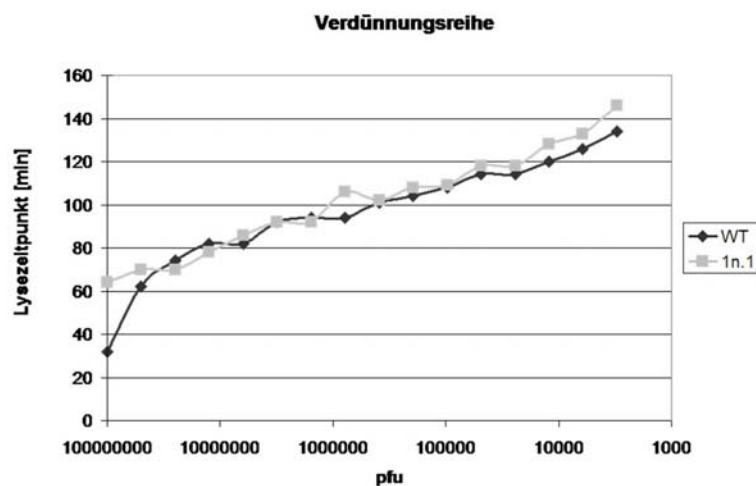


Abb. 3.9: Zusammenhang zwischen Lysezeitpunkt und eingesetzter Phagenmenge.

Ausgehend von einer Verdünnungsreihe eines Bakteriophagenlysates von T7 WT bzw. T7 1n.1 wurden 200 μ l Wirtszellkultur (*E. coli* BLT5615, Über Nacht-Kultur, 1 : 4 verdünnt in M9LB) mit verschiedenen Phagenmengen infiziert. Die Wachstumskurven wurden, wie in Abb. 3.7 beschrieben, aufgenommen, der Lysezeitpunkt (maximale OD_{600}) wurde bestimmt und in Abhängigkeit von der eingesetzten Phagenmenge in logarithmischer Skalierung aufgetragen. Die Phagenmengen der einzelnen Messpunkte unterscheiden sich um Faktor 2.

Es zeigte sich ein logarithmischer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Phagenmenge und dem Lysezeitpunkt (Abb. 3.9). Phagenmengen, die sich um mindestens Faktor 4 unterschieden, führten zu deutlich unterschiedlichen Lysezeitpunkten.

Eine Nutzung der ermittelten Kurven (Abb. 3.9) als Eichkurven zur Bestimmung unbekannter Phagenmengen erschien jedoch problematisch, da die Werte einer Messung zwar vergleichbar waren, die Lysezeitpunkte zwischen den einzelnen Messungen jedoch variierten. So wurde in

Abb. 3.8 für 10^8 pfu ein Lysezeitpunkt von 72 min bestimmt, in Abb. 3.9 ergab sich dagegen ein Lysezeitpunkt von ca. 90 min.

Diese Unterschiede können zum einen durch ein unterschiedliches Wachstumsverhalten der Wirtszellen verursacht worden sein, zum anderen wurden auch in anderen Experimenten Wachstumsunterschiede ungeklärter Ursache zwischen genetisch identischen Bakteriophagen beobachtet. Auf einem Bakterienrasen war z. B. oft eine unterschiedliche Größe der Bakteriophagen-Plaques zu beobachten, obwohl sie identische Individuen enthielten (Daten nicht gezeigt). Die Anfrage beim Hersteller (Novagen, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.) hinsichtlich der Ursache dieses Phänomens konnte nicht beantwortet werden.

Unterschiedliche Lysezeitpunkte für genetisch identische Bakteriophagen innerhalb einer Messung lassen jedoch sicherlich Rückschlüsse auf unterschiedliche Phagenmengen zu. Der Lysezeitpunkt wurde daher herangezogen, um eine spezifische Immobilisierung von Bakteriophagen nachzuweisen.

3.1.2.2.4.2 Spezifische Immobilisierung Biotin-markierter Bakteriophagen

T7 Bakteriophagen mit und ohne Lhcb1-Protein wurden mit Biotin markiert und auf Neutravidin-beschichteten Mikrotiterplatten immobilisiert. Nach Zugabe von Wirtszellkultur wurden die Wachstumskurven der Zellkulturen aufgenommen (vgl. Abb. 3.7). Der Zeitpunkt der maximalen optischen Dichte bei 600 nm wurde als Lysezeitpunkt festgehalten. Verglichen wurden nur die Ergebnisse einer Messreihe, wobei jede Immobilisierung parallel in vier Vertiefungen der Mikrotiterplatte durchgeführt wurde. Die Mittelwerte der vier Parallelmessungen sind in Abb. 3.10 angegeben.

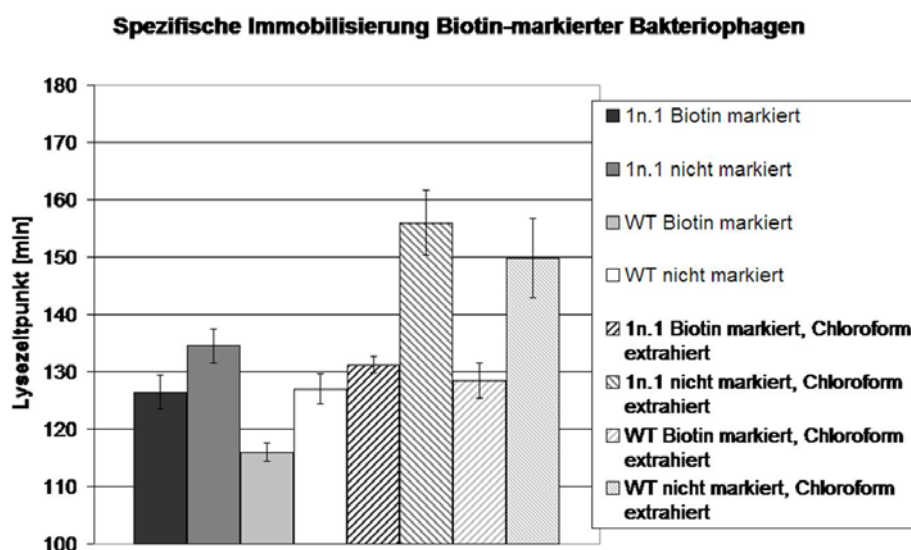


Abb. 3.10: Spezifische Immobilisierung Biotin-markierter Bakteriophagen.

Herstellung der Lysate von T7 1n.1 (1n.1) und T7 WT (WT) wie in Kap. 2.5.4.1 beschrieben. Die Reinigung erfolgte durch Chloroform-Extraktion, Filtration und Pelletierung im Glycerin-Stufengradienten. Die Biotin-Markierung erfolgte wie in Kap. 2.8.6.3 beschrieben. Reduzierung: 1,14 mM TCP, mindestens $3,5 \times 10^5$ TCP-Moleküle pro Phage. Markierung: 45 μ M Biotin-BMCC, mindestens 10^4 Biotin-BMCC pro Phage. Die Markierungsreaktion wurde durch β -Mercaptoethanol gestoppt. Die Hälfte der Ansätze wurde nach der Markierung mit Chloroform extrahiert (siehe Legende). Anschließend wurden die Bakteriophagen zur Aufreinigung durch einen Glyceringradienten (Kap. 2.8.6.2) zentrifugiert und pelletiert. Pro Ansatz wurden 4 Immobilisierungen mit ca. 10^6 Bakteriophagen durchgeführt (vgl. Kap. 2.9.1). Nach der Immobilisierung und den Waschschrritten wurden 200 μ l Wirtszellkultur zugegeben und die Wachstumskurven wurden wie in Abb. 3.7 beschrieben aufgenommen. Pro Ansatz wurden 4 Immobilisierungen durchgeführt, die Mittelwerte der Lysezeitpunkte sowie die Standardabweichungen (Fehlerbalken) sind als Balkendiagramm dargestellt.

Biotinylierte Ansätze zeigten deutlich kürzere Lysezeiten als die unmarkierten Ansätze, woraus auf eine stärkere Bindung Biotin-markierter Bakteriophagen im Vergleich zu unmarkierten geschlossen wurde.

Allerdings zeigte auch T7 WT diese Verkürzung der Lysezeiten, was auf markierbare SH-Gruppen auf der Phagenhülle schließen ließ, die vor einer spezifischen Biotin-markierung stabiler LHCIb-Mutanten unbedingt blockiert werden mussten.

Durch eine Chloroform-Extraktion nach der Biotin-Markierung konnte eine deutlich spezifischere Immobilisierung erreicht werden. Chloroform-extrahierte Ansätze zeigten zwischen biotinylierten und unmarkierten Proben Unterschiede von 21-25 min, während ohne diesen Reinigungsschritt die biotinylierten Ansätze nur um 10 min schneller lysierten. Ein Nachteil der Chloroform-Extraktion ist allerdings der Titerverlust, es muss mit Titer-Rückgängen um Faktor 10^2 gerechnet werden.

3.1.2.2.4.3 Blockierbarkeit von T7 WT

Die Tatsache, dass T7 WT biotinylierbare SH-Gruppen besitzt, erhöhte die Anforderungen an die Blockierung zugänglicher SH-Gruppen vor der spezifischen Biotinmarkierung der SH-Gruppe in stabilen LHCIb-Mutanten. Durch eine Erhöhung des Biotin-Überschusses während der Markierung sollte zunächst geklärt werden, ob eine Sättigung der Markierungsreaktion bereits erreicht ist.

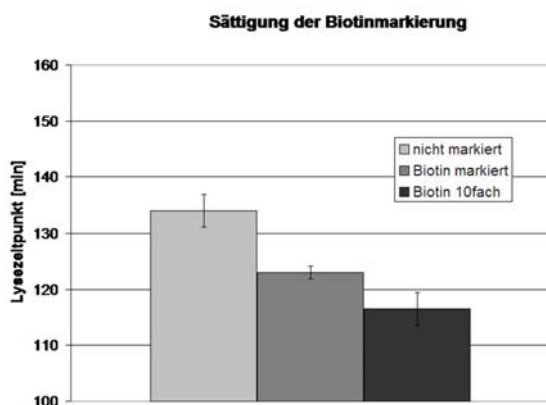


Abb. 3.11: Sättigung der Biotinmarkierung.

T7 WT-Lysate wurden hergestellt und gereinigt, wie in Abb. 3.10 beschrieben. Reduktion: 2,86 mM TCP (mindestens 3×10^5 TCP-Moleküle pro Phage). Markierung: Ansatz „Biotin markiert“: mindestens 6×10^3 Biotinmoleküle pro Phage (60 μ M Biotin; $6,2 \times 10^{12}$ pfu/ml); Ansatz „Biotin 10fach“: mindestens 6×10^4 Biotinmoleküle pro Phage (60 μ M Biotin; $6,2 \times 10^{11}$ pfu/ml). Die Markierungsreaktion wurde durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol beendet und die Ansätze wurden anschließend mit Chloroform extrahiert. Pro Ansatz wurden ca. 10^7 Bakteriophagen auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 4 Parallelmessungen.

Abb. 3.11 zeigt, dass auch bei 6×10^3 fachem Überschuss von Biotinmolekülen pro Phage noch keine Sättigung erreicht werden konnte. Eine Steigerung des Biotin-Überschusses um Faktor 10 führte zu einer Verkürzung der Lysezeit um 6,5 min.

Die effizienteste Blockierung wurde durch 40 mM Jodacetamid erreicht (Abb. 3.6), wobei auch in diesem Fall noch eine Biotinmarkierung nachgewiesen werden konnte. Eine Blockierung der Bakteriophagen-SH-Gruppen durch 40 mM Jodacetamid war jedoch nicht durchführbar, da diese Behandlung zu einem großen Verlust an Bakteriophagen bzw. zu einer starken Verlangsamung der Lyse führte. Ein weiteres Problem war, dass auf die Verwendung von β -Mercaptoethanol zum Beenden der Blockierungsreaktion verzichtet werden musste, da dieses nicht mehr vollständig entfernt werden konnte und die nachfolgende Markierung behinderte. Zur Abtrennung des Jodacetamid erwies sich eine zweifache Zentrifugation durch einen Glyzeringradienten als ausreichend. Die Phagen-Verluste während der Reinigungsschritte waren so groß, dass auf eine Chloroform-Extraktion verzichtet werden

musste, da andernfalls die für die Immobilisierung erforderliche Menge von 10^6 Bakteriophagen nicht erreicht werden konnte.

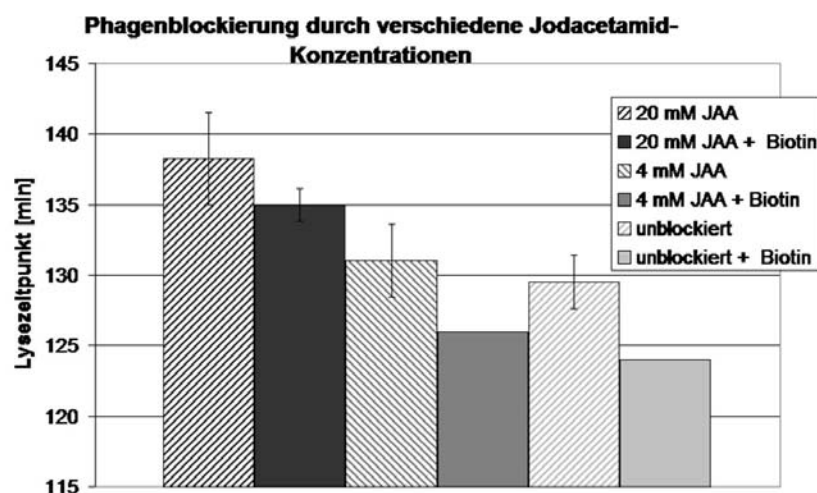


Abb. 3.12 Phagenblockierung durch verschiedene Jodacetamidkonzentrationen.

T7 WT-Lysate wurden hergestellt und gereinigt, wie in Abb. 3.10 beschrieben. Die Blockierung wurde durchgeführt, wie in Kap. 2.8.6.1 angegeben. Reduktion: 2,4 mM TCP, mindestens 2×10^5 TCP-Moleküle pro Phage. Blockierung mit der angegebenen Jodacetamidkonzentration (20 mM Jodacetamid entspricht mindestens 2×10^9 Jodacetamidmoleküle pro Phage). Zur Aufreinigung wurde die Probe zweimal durch einen Glycerinstufengradienten (vgl. Kap. 2.8.6.2) zentrifugiert. Reduktion und Biotin-Markierung wie in Abb. 3.10. Auf das Abstoppen der Reaktion mit β -Mercaptoethanol wurde verzichtet. Die Aufreinigung erfolgte durch zweimalige Pelletierung im Glycerinstufengradienten. Nach Resuspendierung der Bakteriophagen wurde der Phagentiter bestimmt. Pro Vertiefung wurden 10^6 Bakteriophagen auf die Neutravidin-Platte aufgetragen. Die gezeigten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier Parallelproben errechnet.

Obwohl die aufgetragenen Phagenmengen für die verschiedenen Ansätze konstant gehalten wurden, zeigte sich eine deutliche Verlangsamung der Lyse bei steigenden Jodacetamid-Konzentrationen. Evtl. wurde die Infektiösität der Bakteriophagen durch die Jodacetamidbindung reduziert. Der Vergleich der markierten und unmarkierten Proben, die mit gleicher Jodacetamid-Konzentration behandelt wurden, zeigte, dass auch nach einer Blockierung mit 20 mM Jodacetamid eine Biotinmarkierung stattfand.

Da keine Bedingungen gefunden werden konnten, die eine vollständige Blockierung der Phagen-SH-Gruppen erlaubten, war es nicht möglich, die SH-Gruppen-Markierung zur Selektion stabiler LHCIIB-Mutanten im Phage Display-System zu verwenden.

3.1.2.3 FACS – Fluorescence- activated cell sorting

Eine Möglichkeit einer direkten Sortierung von Bakteriophagen mit rekonstituierten LHCIIB-Komplexen ergab sich durch die Verwendung eines Gerätes, das zur Sortierung Fluoreszenzmarkierter Zellen genutzt wird.

In einem solchen FACS-(Fluorescence- activated cell sorting)-Gerät werden die Zellen in einem Probenstrom einzeln durch einen Laserstrahl geleitet. Ein Fluoreszenzsignal führt zur Aktivierung der „High voltage deflection plates“, die Zelle wird abgelenkt und erreicht das entsprechende Sammelgefäß.

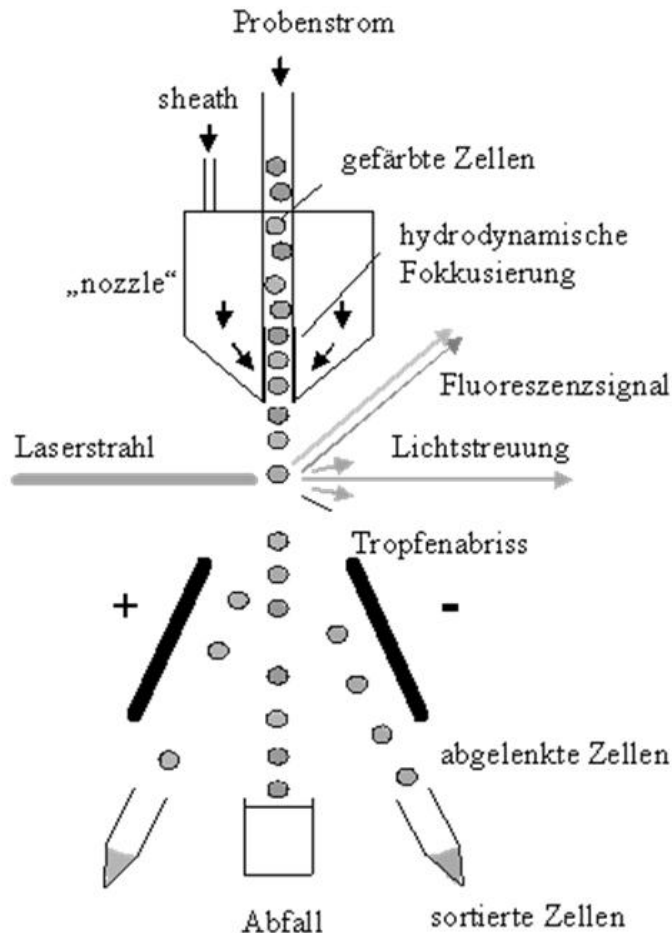


Abb. 3.13: Schematische Darstellung des Sortiervorgangs (www.toxikologie.uni-mainz.de/facslab).

In Zusammenarbeit mit Dr. S. Schmitt (FacsLab, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz) wurde versucht, eine Fluoreszenz-abhängige Sortierung der Bakteriophagen zu erreichen. T7 Lhcb1-Mutanten, die stabile Pigment-Protein-Komplexe bilden, sollten durch das gebundene Chlorophyll fluoreszieren, während nicht rekonstituierte T7 Lhcb1-Mutanten keine Fluoreszenz zeigen sollten. In einem Vorversuch sollte zunächst geklärt werden, ob für rekonstituierte T7 Lhcb1-Mutanten ein Fluoreszenz-Signal nachweisbar ist. Als Negativkontrolle wurden gleich behandelte T7 WT-Phagen verwendet.

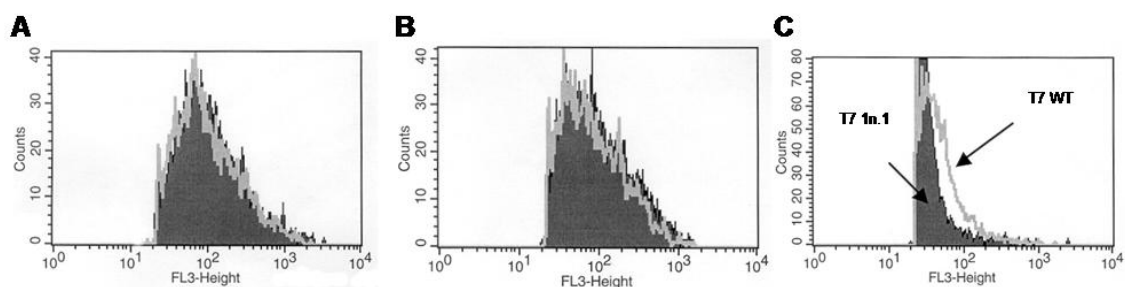


Abb. 3.14: FACS-Messung.

Die Lysate von T7 1n.1 und T7 WT wurden wie in Kap. 2.5.4.2 hergestellt, und durch Chloroform-Extraktion, Filtration und Pelletierung in einem Glycerinstufengradienten gereinigt. Die Bakteriophagen wurden in Rekonstitutionspuffer (100 mM Na-P, pH 7,5; 12,5 % Saccharose) mit 0,2 % SDS resuspendiert und mit 0,5 µg/µl Chlorophyll durch SDS-Verdünnung rekonstituiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation durch ein Glycerinkissen, wie in Kap. 2.11 beschrieben. Ein Ansatz (A)

wurde direkt in PBS mit 0,1 % LM aufgenommen, die beiden anderen Ansätze wurden erneut durch ein Glycerinkissen zentrifugiert. Dazu wurde ein Ansatz zunächst 30 min bei RT in Rekonstitutionspuffer mit 0,1 % LM (B), ein weiterer (C) in Rekonstitutionspuffer mit 1 % OG und 0,1 % SDS inkubiert. Nach der Pelletierung wurden alle Ansätze in PBS mit 0,1 % LM aufgenommen. Der Phagentiter lag bei 10^{12} pfu/ml. Für die FACS Messung wurde um Faktor 4 mit PBS incl. 0,1 % LM verdünnt. Auf der X-Achse ist die Fluoreszenzintensität bei 610 nm (Anregung mit blauem Laserlicht), auf der Y-Achse die Anzahl der Partikel pro Sekunde (bei einer Durchflussrate von 12 μ l/sec) aufgetragen. Hellgrau: T7 WT. Dunkelgrau: T7 1n.1.

Sowohl in den Proben mit T7 1n.1-Phagen als auch in den T7 WT-Proben konnten Partikel einheitlicher Größe und Granularität beobachtet werden, deren Fluoreszenz über der Autofluoreszenz des Puffers (nicht gezeigt) lag. Wie in Abb. 3.14 zu sehen, unterschieden sich die Negativkontrollen (T7 WT) in keinem der Ansätze wesentlich von T7 1n.1. Beide Proben zeigten unter den verschiedenen Bedingungen vergleichbare Fluoreszenz und ähnliche Durchflussraten der fluoreszierenden Partikel. Lediglich in Ansatz C zeigten sich Unterschiede zwischen den beiden Proben, allerdings war die Fluoreszenz der Negativkontrolle eher stärker.

Es konnte nicht geklärt werden, ob die beobachtete unspezifische Fluoreszenz durch eine unspezifische Bindung von Chlorophyll an die Bakteriophagenoberfläche hervorgerufen wurde, oder ob es sich bei den beobachteten fluoreszierenden Partikeln evtl. um Chlorophyllaggregate einheitlicher Größe handelte.

Da eine Kontrolle der Rekonstitution durch eine Messung des Energietransfers vor dem Hintergrund an freiem Pigment aufgrund der geringen Lhcb1-Konzentrationen im Phage Display-System (max. 0,165 μ M Lhcb1) nicht möglich war, kann nicht ausgeschlossen werden, dass keine Bakteriophagen mit rekonstituierten Lhcb1-Proteinen vorhanden waren und deswegen lediglich die Hintergrundfluoreszenz beobachtet wurde.

3.1.2.4 Trypsinverdau

Im Gegensatz zu Carboxypeptidasen ist für die Endoproteasen Trypsin und Thermolysin der spezifische Abbau ungefalteter Lhcb1-Proteine bekannt (Paulsen et al., 1993; Hobe et al., 2000). Wie schon in Kap. 3.1.2.1 erwähnt, sind rekonstituierte Lhcb1-Proteine nicht vollständig vor einer Proteolyse geschützt, sondern zeigen, je nach Protease, unterschiedliche Sensitivitäten im N-terminalen Bereich des Proteins. Trypsin, z. B., verkürzt den N-Terminus des Lhcb1-Proteins um ca. 1,5 kDa (Paulsen et al., 1993). Eine proteolytische Spaltung in diesem Bereich würde zu einer Trennung des rekonstituierten LHCIIB-Komplexes von der Bakteriophagenoberfläche führen und muss daher vermieden werden.

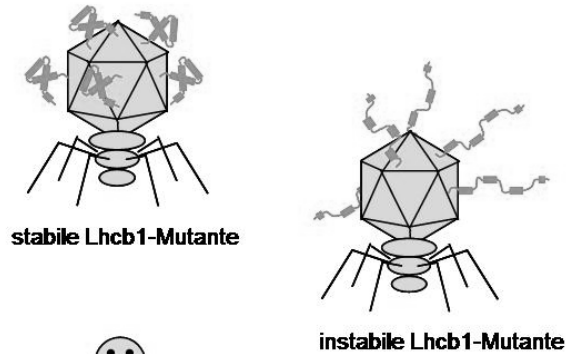
Dieses Problem machte den Austausch des Protease-sensitiven N-Terminus gegen ein künstliches Fragment aus zwei Wiederholungen der Sequenz Gly₄Ser notwendig, wodurch die Spaltung des Fusionsproteins verhindert werden konnte (Abb. 3.16) und eine spezifische Sortierung rekonstituierter LHCIIB-Komplexe durch einen proteolytischen Abbau der Apoproteine möglich wurde.

Abb. 3.15 zeigt die schematische Darstellung der Prozedur, die eine Selektion stabiler LHCIIB-Mutanten erlauben sollte, und die in den folgenden Experimenten an mehreren Punkten überprüft wurde.

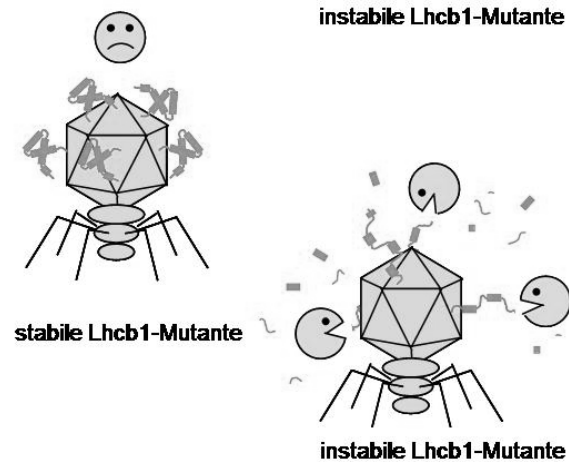
Ausgehend von einer Situation, in der lediglich die stabilen Lhcb1-Mutanten als Pigment-Protein-Komplexe vorliegen, würde Trypsin selektiv die ungefalteten, d.h. instabilen Lhcb1-Mutanten abbauen. In einem nachfolgenden Immobilisierungsschritt mithilfe von Lhcb1-Antikörpern sollten daher bevorzugt die Bakteriophagen gebunden werden, die für stabile LHCIIB-Mutanten kodieren und deren Lhcb1-Proteine durch die Rekonstitution vor der Protease Trypsin geschützt sind.

Selektion stabiler LHCIIB-Mutanten durch Trypsinverdau ungefalteter Lhcb1-Proteine

1. Ausgangssituation



2. Trypsinverdau der ungefalteten Lhcb1-Proteine



3. Immobilisierung der verbliebenen Lhcb1-Proteine

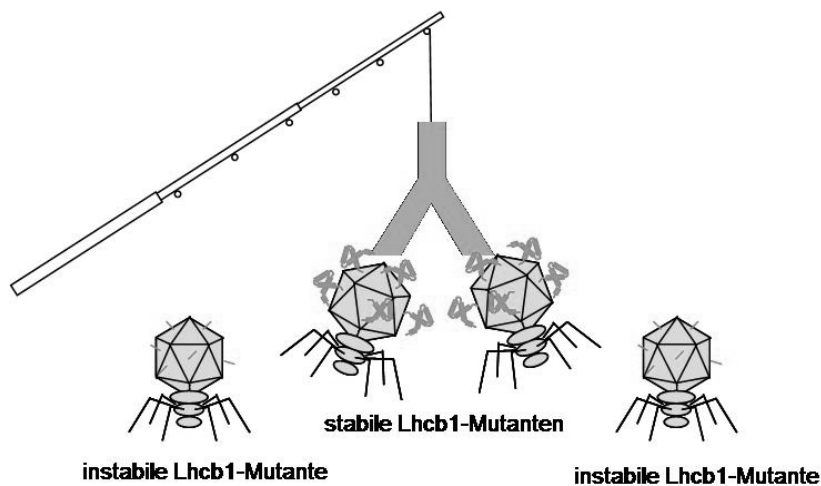


Abb. 3.15 Schematische Darstellung der Selektion stabiler LHCIIB-Mutanten durch den selektiven Abbau instabiler Mutanten.

3.1.2.4.1 Nachweis des Fusionsproteins nach Rekonstitution und Trypsinverdau

Bei Auftrag von ca. 2×10^{11} pfu pro Bahn (entspricht 125 ml Kulturvolumen) konnte das p10-Lhcb1-Fusionsprotein in einem Western Blot nachgewiesen werden. Falls das Lhcb1-Protein auf der Bakteriophagenhülle durch Rekonstitution vor einem proteolytischen Abbau geschützt ist, sollte sich nach Rekonstitution und Trypsinverdau ein Signal für das Fusionsprotein zeigen, während in einer nicht-rekonstituierten Kontrolle nach einem Trypsinverdau kein Fusionsprotein mehr nachweisbar sein sollte. In Abb. 3.16 ist ein Vergleich der Lhcb1-Bakteriophagen mit dem ursprünglichen N-Terminus (T7 D7f.3) und mit dem veränderten N-Terminus (T7 GlySer) gezeigt.

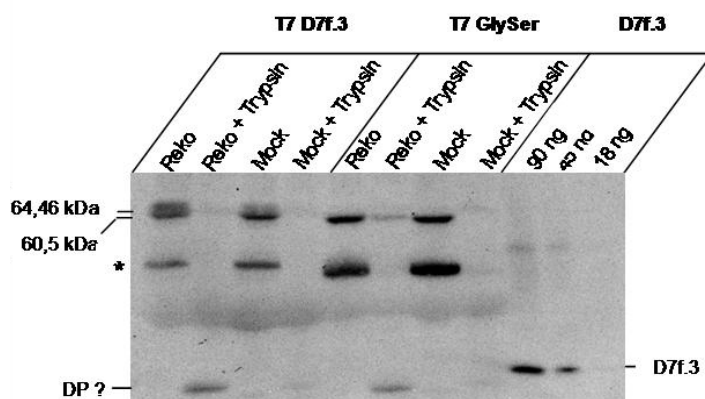


Abb. 3.16: Nachweis des Fusionsproteins nach Rekonstitution und Trypsinverdau.

Phagenlysate von T7 D7f.3 und T7 GlySer wurden wie in Kap. 2.5.4.2 hergestellt und durch Chloroform-Extraktion, Filtration und Pelletierung im Glyzeringradienten gereinigt. Die Bakteriophagen wurden in Solubilisierungspuffer aufgenommen und durch Detergens-Wechsel (ohne DTT; 1 µg/µl Chlorophyll; 0,4 µg/µl Xanthophyll; pH 9) rekonstituiert. Reko: Rekonstitution mit Pigmenten. Mock: Durchführung der Rekonstitutionsprozedur ohne Pigmente. Die Proben wurden für 30 min bei RT mit 0,1 mg/ml Trypsin inkubiert, bzw. die Inkubation wurde ohne die Anwesenheit von Trypsin durchgeführt. Bedingungen wie in Kap. 2.8.5.2 mit 1 mg/ml TPCK. Nach dem Verdau wurden die Proben durch Kochen denaturiert und die Bakteriophagen-DNA wurde mit DNaseI verdaut (30 min RT, 0,04 mg/ml DNaseI, 20 mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂). Nach einer Acetonfällung wurden die Protein-Pellets in Sparmix aufgenommen und auf ein PAA-Gel (10 % Acrylamid; 1,5 mm) aufgetragen. Der Auftrag pro Bahn entsprach 2×10^{11} pfu. Der Nachweis des Lhcb1 erfolgte in einem Western Blot unter Verwendung des Chemilumineszenz-Substrates. Belichtungszeit: 1h. Die Molekulargewichte der p10-Fusionsproteine sind angegeben. DP: N-terminal verkürztes Verdauprodukt von LHCIIB. * Verkürztes Fusionsprotein?

Die p10-Lhcb1-Fusionsproteine konnten mithilfe des Anti-Lhcb1-Antikörpers nachgewiesen werden. Zusätzlich zu diesen Signalen trat jedoch in den unverdauten Proben ein offensichtlich verkürztes Fusionsprotein von etwa 45 kDa Länge auf (* in Abb. 3.16), auf das in Kap. 3.3.2 noch näher eingegangen wird. Da dieses Protein jedoch durch Trypsin abgebaut wurde (Abb. 3.16), sollte es während eines Selektionsexperimentes keine Rolle spielen.

Die Signalintensitäten wurden bestimmt und mit den Lhcb1-Signalen bekannter Menge verglichen. Daraus ergaben sich Mengen von ca. 40-50 ng Lhcb1 in den T7 D7f.3-Proben und 70-90 ng Lhcb1 in den T7 GlySer-Proben. Das entspricht etwa 5-10 Lhcb1-Proteinen pro pfu und deckt sich damit mit den Angaben des Herstellers (Novagen, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.).

Nach Rekonstitution und Trypsinverdau von T7 D7f.3 war kein Fusionsprotein mehr nachweisbar. Allerdings tauchte unterhalb des D7f.3-Signals ein Lhcb1-Signal auf, bei dem es sich evtl. um das N-terminal verkürzte Degradationsprodukt handeln könnte, das nach einer proteolytischen Spaltung in dem oben erwähnten ungeschützten N-terminalen Bereich zu

erwarten wäre (DP in Abb. 3.16). Die Signalintensität entsprach ca. 60 % der unverdauten Probe.

Bereits das Auftreten dieses Degradationsproduktes in rekonstituierten Proben deutete auf eine erfolgreiche Rekonstitution hin. Für eine Selektion ist jedoch ein vollständiger Schutz des Fusionsproteins vor einem proteolytischen Abbau notwendig.

Wie oben erwähnt, wurde zu diesem Zweck der Trypsin-sensitive N-terminale Abschnitt des Lhcb1 gegen ein künstliches, Trypsin-resistentes Fragment aus Glycin- und Serinresten ([Gly₄Ser]₂) ausgetauscht. Wie in Abb. 3.16 (T7 GlySer) zu sehen, war nach einem Austausch des N-Terminus gegen das Trypsin-resistente Fragment ca. 20 % des Fusionsproteins nach einer Rekonstitution vor einem proteolytischen Abbau geschützt, während nicht-rekonstituierte Fusionsproteine vollständig abgebaut wurden. Ca. 30 % der rekonstituierten Komplexe wurden weiterhin von der Phagenhülle abgespalten. Als mögliche Ursache wurde eine Verunreinigung des Trypsins durch andere Endoproteasen in Betracht gezogen.

Die Tatsache, dass nach Trypsinverdau ca. 20 % der rekonstituierten Fusionsproteine erhalten blieben, während nicht-rekonstituierte Lhcb1-Proteine vollständig abgebaut wurden, sollte eine spezifische Selektion stabiler LHCIIB-Mutanten erlauben, falls die Bedingungen so gewählt werden, dass während des Trypsinverdaus ausschließlich die stabileren Mutanten mit Pigmenten rekonstituiert vorliegen.

In weiteren Experimenten wurde versucht, eine spezifische Immobilisierung der Lhcb1-Phagen und schließlich eine spezifische Immobilisierung rekonstituierter Lhcb1-Proteine nach Trypsinverdau nachzuweisen.

3.1.2.4.2 Nachweis einer spezifischen Immobilisierung der Lhcb1-Phagen durch Anreicherungsexperimente

Zum Nachweis einer spezifischen Immobilisierung der Lhcb1-Phagen mithilfe von Anti-Lhcb1-Antikörpern wurde versucht, Lhcb1-Phagen aus einer Mischung mit T7 WT-Phagen anzureichern. Die Anreicherungsfaktoren, die unter verschiedenen Bedingungen erreicht werden konnten, wurden verglichen.

T7 Lhcb1- und T7 WT-Phagen konnten mithilfe eines Anti-Lhcb1-Antikörpers in einem „Plaque-Lift“ voneinander unterschieden werden. Dazu wurden die Bakteriophagen auf einem Bakterienrasen (*E. coli* BLT5615) ausplattiert. Die Plaques wurden anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen, wo die Lhcb1-Proteine nachgewiesen werden konnten.

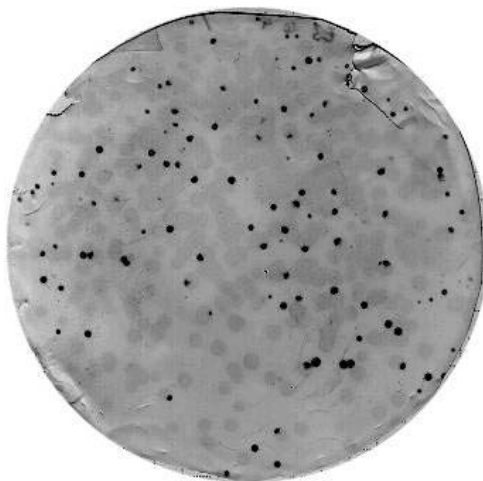


Abb. 3.17: Plaque-Lift (Beispiel).

Die Bakteriophagen, in diesem Fall eine Mischung aus T7-Lhcb1 und T7-WT, wurden auf einem Bakterienrasen (*E. coli* BLT5615) ausplattiert. Die Plaques wurden anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Der Nachweis der Lhcb1-Proteine erfolgte mithilfe eines Anti-Lhcb1-Antikörpers unter Verwendung des BCIP/NBT-Substrates.

Abb. 3.17 zeigt exemplarisch den Lhcb1-Nachweis in einem „Plaque-Lift“. Plaques von Lhcb1-Phagen, die meist kleiner sind als T7 WT-Plaques, zeigen sehr starke Signale, während die größeren T7 WT-Plaques nur schwach mit dem Antikörper reagieren. Mithilfe solcher „Plaque-Lifts“ wurden die im Folgenden gezeigten Verhältnisse von T7 Lhcb1- : T7 WT-Phagen ermittelt. Aus dem Vergleich des Verhältnisses in der Ausgangsmischung und des Eluates nach einer Immobilisierung lässt sich ein Anreicherungsfaktor für T7 Lhcb1 bestimmen.

3.1.2.4.2.1 Vergleich verschiedener Elutionsbedingungen

Bisherige Versuche zur spezifischen Immobilisierung (Kap. 3.1.2.2.4.2) zeigten, dass ein gewisser Hintergrund von unspezifisch immobilisierten Bakteriophagen nicht zu vermeiden war. Diese unspezifische Immobilisierung war auch durch Waschschrte unter sehr stringenten Bedingungen (1 % SDS oder 10 % Tween) nicht zu verhindern (Daten nicht gezeigt). Der folgende Vergleich verschiedener Elutionsbedingungen sollte klären, ob evtl. eine gezielte Elution der spezifisch immobilisierten T7 Lhcb1-Phagen möglich ist.

	Ausgangsmischung	Eluate			
		Lyse	1 M NaCl	1 % SDS	1 mg/ml D7f.3 0,1 % SDS
T7 GlySer : T7 WT	1 : 153	1 : 30	1 : 16	1 : 3	1 : 6
Anreicherungsfaktoren		5,1	9,6	51	25,5
T7 GlySer- Wiedergewinnungsraten [%]			0,0335	0,675	0,34

Tab. 3.1: Vergleich verschiedener Elutionsbedingungen nach Immunopräzipitation und anschließender Immobilisierung auf Protein G-Platten.

Lysate von T7 GlySer- und T7 WT-Phagen wurden wie in Kap. 2.5.4.1 hergestellt, durch Chloroform-Extraktion, Filtration und Pelletierung in einem Glyzeringradienten gereinigt. Die gereinigten Phagen wurden in IPT-Puffer aufgenommen, im angegebenen Verhältnis gemischt und nach Immunopräzipitation mit Anti-Lhcb1-Serum (SA7429) auf einer Protein G-Platte immobilisiert. Pro Vertiefung wurden 3×10^{10} pfu eingesetzt. Nach Elution für 3 h bei 25-30°C mit 100 µl 10 mM Tris-HCl (pH 7,8) mit den entsprechenden Zusätzen bzw. nach Lyse der zugegebenen Wirtszell-Kultur (200 µl, verdünnte ÜN-Kultur in M9LB-Carbenicillin), wurden die Eluate abgezogen und ein Plaque-Lift (siehe Abb. 3.17) durchgeführt. Die Plaques mit und ohne Lhcb1-Signal wurden ausgezählt und ins Verhältnis gesetzt. Aus dem Verhältnis der Ausgangsmischung und dem Verhältnis im jeweiligen Eluat wurden die Anreicherungsfaktoren berechnet. Der Anteil der aufgetragenen T7 GlySer Bakteriophagen, der in den Eluaten wieder gefunden wurde, ist als Wiedergewinnungsrate in % angegeben. Da die „Elution“ durch Lyse eine Amplifikation einschließt, wurde in diesem Fall keine Wiedergewinnungsrate berechnet.

Der Vergleich der Anreicherungsdaten unter verschiedenen Elutionsbedingungen zeigte sehr deutliche Unterschiede in der Spezifität der Elution. 1 % SDS löste bevorzugt T7 Lhcb1-Phagen von der Mikrotiterplatte, wobei nicht unterschieden werden kann, ob die Bindung des Antikörpers an ProteinG, oder die Bindung des Lhcb1-Proteins an den Antikörper durch die Anwesenheit des Detergens geschwächt wurde.

Durch Elution mit 1 mg/ml D7f.3, das durch Konkurrenz um Antikörperbindungsstellen zu einer spezifischen Elution von T7 Lhcb1-Phagen führen sollte, konnte ebenfalls eine sehr gute Anreicherung der T7 GlySer-Phagen erreicht werden. Eine Elution mit 1 M NaCl führte nur zu einer geringen Anreicherung der T7 Lhcb1-Phagen.

Entsprechend der Anreicherungsfaktoren schwankten auch die Wiedergewinnungsraten von T7 GlySer, so dass eine Anreicherung tatsächlich auf eine gesteigerte Elution spezifisch

gebundener T7 Lhcb1-Phagen und nicht auf eine verminderte Elution der unspezifisch gebundenen T7 WT-Phagen zurückzuführen sein sollte. Allerdings wurden maximal 0,7 % der eingesetzten T7 Lhcb1-Phagen wieder gefunden, wobei unklar blieb, ob die restlichen Bakteriophagen nicht gebunden oder nicht eluiert wurden.

Die Elution durch Lyse, die die vollständigste Elution immobilisierter Bakteriophagen ermöglichen sollte, zeigte den niedrigsten Anreicherungsfaktor, der vermutlich durch einen schnelleren Generationszyklus von T7 WT- im Vergleich zu T7 Lhcb1-Phagen zu erklären ist. Es konnte oft beobachtet werden, dass Wirtszellkulturen, die mit T7 WT-Phagen infiziert wurden, deutlich schneller lysierten als Kulturen, die mit der gleichen Anzahl an T7 Lhcb1-Phagen beimpft wurden. Aus Abb. 3.9 geht dieser Unterschied nicht hervor, die unterschiedliche Größe der T7 WT-Plaques und der T7 Lhcb1-Plaques in Abb. 3.17 ist jedoch ein weiterer Hinweis auf eine unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit. Durch ein schnelleres Wachstum haben T7 WT-Phagen während der Elution durch *in situ* Amplifizierung einen Selektionsvorteil, der den Anreicherungsfaktor für T7 Lhcb1-Phagen reduziert.

3.1.2.4.2.2 Vergleich der Anreicherung auf passiv beschichteten Anti-Lhcb1- und auf Protein G-Platten mit Anti-Lhcb1-Antikörpern

Im folgenden Versuch wurden die Anreicherungsraten von T7 Lhcb1-Phagen auf Mikrotiterplatten verglichen, die durch verschiedene Methoden mit Anti-Lhcb1-Antikörpern beschichtet wurden.

Antikörper können zum einen passiv auf bestimmten Protein-bindenden Mikrotiterplatten immobilisiert werden, zum anderen ist auch eine aktive Bindung der Anti-Lhcb1-Antikörper an käuflich zu erwerbende Protein G-Platten möglich. Protein G bindet an die konstanten Domänen von Antikörpern und ermöglicht so die Immobilisierung der Antikörper in einer funktionalen Form.



Abb. 3.18 Schematische Darstellung der beiden Beschichtungsmethoden.

Im Gegensatz zu der Immunopräzipitationsmethode, die in Kap. 3.1.2.4.2.1 angewendet wurde, wurden hier zunächst beide Platten mit dem Anti-Lhcb1-Antikörper beschichtet. Die Antikörper, die in diesem, wie auch den folgenden Experimenten verwendet wurden, waren durch eine Affinitätschromatographie gereinigt worden.

In diesem Fall wurden die Bakteriophagenlysate weder gereinigt noch aufkonzentriert. Unmittelbar nach der Zellyse wurden die Bakterienreste abzentrifugiert, wobei auf eine Zugabe von NaCl verzichtet wurde. Vor der Immobilisierung wurden die Lysate mit 0,01 % SDS versetzt. Zur Herstellung der Antikörper wurde Lhcb1 in SDS eingesetzt, weshalb möglicherweise eine Bindung von SDS-Molekülen an das Lhcb1-Protein für die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung von Bedeutung ist.

	Ausgangsmischung	Eluate	
		Passive Beschichtung	Protein G
T7 GlySer : T7 WT	1 : 269	1 : 14,7	1 : 1,5
Anreicherungsfaktoren		18,2	179
T7 GlySer- Wiedergewinnungsraten [%]		0,026	0,1

Tab. 3.2: Vergleich der Immobilisierung auf passiv beschichteten Platten und auf Protein G-Platten.

T7 GlySer-Phage und T7 WT-Phagen aus ungereinigten Lysaten (die Lysate wurden nach der Lyse ohne NaCl-Zugabe durch Zentrifugation geklärt) wurden im Verhältnis 1 : 269 gemischt und nach Zugabe von 0,01 % SDS für 30 min bei RT in den beschichteten Platten inkubiert. Pro Vertiefung wurden 2×10^{10} pfu eingesetzt. Beide Platten wurden mit 1 µg affinitätsgereinigtem Antikörper pro Vertiefung beschichtet. Die Elution erfolgte durch Inkubation für 3 h bei RT in 1 % SDS (10 mM Tris-HCl pH 7,8). Die Zahlen geben das Verhältnis von Plaques mit Lhcb1-Signal zu denen ohne Lhcb1-Signal nach einem Plaque-Lift an. Aus dem Verhältnis der Ausgangsmischung und den Verhältnissen im jeweiligen Eluat wurden die Anreicherungsfaktoren berechnet. Der Anteil der aufgetragenen T7 GlySer Bakteriophagen, der in den Eluaten wieder gefunden wurde, ist als Wiedergewinnungsrate in % angegeben.

Der Vergleich der Anreicherungsfaktoren auf den passiv beschichteten Anti-Lhcb1-Platten und den Protein G-Platten bestätigt den nach der Theorie zu erwartenden Vorteil einer aktiven und funktionalen Immobilisierung der Antikörper auf Protein G-Platten. Nach einer Immobilisierung der Antikörper auf Protein G-Platten konnte eine um Faktor 10 bessere Anreicherung erreicht werden.

Die verbesserte Anreicherung im Vergleich zu Kap. 3.1.2.4.2.1 könnte auf die Verwendung des affinitätsgereinigten Antikörpers zurückzuführen sein. Allerdings wurde in Kap. 3.1.2.4.2.1 eine Immunopräzipitation durchgeführt, während die Bakteriophagen in diesem Fall durch immobilisierte Antikörper gebunden wurden, was evtl. eine spezifischere Immobilisierung erlaubte.

Anreicherungsfaktoren in dieser Größenordnung konnten in den folgenden Versuchen nicht erreicht werden. Evtl. spielt die Behandlung der Bakteriophagen vor der Immobilisierung eine entscheidende Rolle, da in diesem Fall im Unterschied zu den bisherigen und den folgenden Versuchen eine Anreicherung der T7 GlySer-Phagen aus den unbehandelten Lysaten durchgeführt wurde.

3.1.2.4.2.3 Anreicherung von Lhcb1-Phagen unter Selektionsbedingungen

Um eine Selektion stabiler LHCIIB-Mutanten zu erreichen, müssen die phagen-gebundenen Lhcb1-Proteine zunächst rekonstituiert und anschließend mit Trypsin behandelt werden. Die Pufferbedingungen während der Immobilisierung sind demnach notwendigerweise verschieden von den Bedingungen in Kap. 3.1.2.4.2.2.

Das folgende Experiment sollte klären, welche Anreicherungsfaktoren unter Selektionsbedingungen zu erreichen sind. Dazu wurde mit einer Mischung aus T7 GlySer und T7 WT ein Detergenswechsel mit und ohne Pigmente durchgeführt. Anschließend wurden die Proben wie während eines Trypsinverdau behandelt, allerdings wurde auf die Zugabe der Protease verzichtet. Die Proben wurden schließlich auf einen pH von 7,5 eingestellt und auf die Mikrotiterplatte aufgetragen.

	Ausgangsmischung	Eluate	
		Rekonstituierte Probe	Kontrolle ohne Pigment
T7 GlySer : T7 WT	1 : 72	1 : 12	1 : 4
Anreicherungsfaktoren		6	18
T7 GlySer-Wiedergewinnungsrate [%]		0,002	0,035

Tab. 3.3: Vergleich der Anreicherung unter Selektionsbedingungen in Gegenwart von Pigmenten und ohne Pigmente.

T7 GlySer und T7 WT-Phagen aus ungereinigten Lysaten (die Lysate wurden nach der Lyse lediglich durch Zentrifugation geklärt) wurden im Verhältnis 1 : 72 gemischt. Für die Rekonstitution wurde die Mischung im Verhältnis 1 : 1 mit 2 x Solubilisierungspuffer verdünnt. Die Proben wurden durch Detergenswechsel rekonstituiert (ohne DTT; 1 µg/µl Chlorophyll; 0,4 µg/µl Xanthophyll; pH 9), bzw. einem Detergenswechsel ohne Pigmente unterzogen. Nach der Rekonstitution: Zugabe von 10 mM Hepes-KOH (pH 8) und 1 mM TPCK. 30 min Inkubation bei RT. Zugabe von 0,5 mM PMSF und 40 mM HCl. Zentrifugation: 5 min, 12000 rpm, 4°C. Der Überstand wurde auf eine Protein G-Platte mit affinitätsgereinigtem Antikörper aufgetragen. Pro Vertiefung wurden 4 x 10¹⁰ pfu eingesetzt. Die Elution erfolgte durch Inkubation für 3 h bei RT in 1 % SDS (10 mM Tris-HCl pH 7,8). Die Zahlen geben das Verhältnis von Plaques mit Lhcb1-Signal zu denen ohne Lhcb1-Signal nach einem Plaque-Lift an. Aus dem Verhältnis der Ausgangsmischung und den Verhältnissen im jeweiligen Eluat wurden die Anreicherungsfaktoren berechnet. Der Anteil der aufgetragenen T7 GlySer Bakteriophagen, der in den Eluaten wieder gefunden wurde, ist als Wiedergewinnungsrate in % angegeben.

Die Anreicherungsfaktoren und T7-GlySer-Wiedergewinnungsraten, die unter Selektionsbedingungen erreicht werden konnten, lagen weit unter dem Anreicherungsfaktor, der in Kap. 3.1.2.4.2.2 ausgehend von unbehandelten Lysaten und Immobilisierung in LB mit 0,01 % SDS erreicht worden war. Als Ursache wurden die veränderten Detergensbedingungen in Betracht gezogen, da die Immobilisierung in diesem Fall nach einem Detergenswechsel, d.h. in 1 % OG erfolgte.

Neben den generell reduzierten Anreicherungsfaktoren fiel ein Unterschied zwischen der Probe mit Pigmenten und der Kontrolle ohne Pigmente auf. Der Anreicherungsfaktor der Probe mit Pigmenten lag um Faktor 3 unter dem Anreicherungsfaktor der Kontrolle. Auch die Pigmente schienen die Immobilisierung der Lhcb1-Phagen demnach negativ zu beeinflussen.

Eine Reinigung der Bakteriophagen und ein Pufferwechsel nach Rekonstitution und Trypsinverdau erschienen demnach unbedingt erforderlich, und sollten durch Pelletierung der Bakteriophagen mittels Ultrazentrifugation erreicht werden.

3.1.2.4.3 Nachweis der möglichen Anreicherung rekonstituierter Lhcb1-Mutanten

Der Vergleich der Anreicherungsfaktoren in einer Probe, die rekonstituiert und mit Trypsin behandelt wurde, und einer Probe, die nur mit Trypsin behandelt wurde, sollte zeigen, ob eine Anreicherung rekonstituierter Lhcb1-Mutanten durch die Selektionsprozedur zu erreichen und mit welchen Anreicherungsfaktoren zu rechnen ist.

Dazu wurden Phagenmischungen durch Detergenswechsel rekonstituiert bzw. einem Detergenswechsel ohne Pigmente unterzogen. Beide Proben wurden mit Trypsin behandelt. Zur Kontrolle wurde eine unverdaute rekonstituierte Probe ebenfalls immobilisiert. Zwei verschiedene Mischungen im Verhältnis 1 : 10 und 1 : 100 wurden eingesetzt.

Um bessere Anreicherungsfaktoren als in Kap. 3.1.2.4.2.3 zu erreichen, wurden die Proben nach Rekonstitution und Detergenswechsel zweimal durch ein Kissen aus 40 % Glycerin zentrifugiert. Die Bakteriophagenpellets wurden in TBS mit 0,01 % SDS aufgenommen und vor dem Auftrag auf die Mikrotiterplatte für 30 min bei 37°C inkubiert, um evtl. noch bestehende Pigment-Protein-Komplexe zu denaturieren.

	Ausgangsmischung	Eluate		
		Rekonstituiert	Rekonstituiert und verdaut	Kontrolle ohne Pigmente verdaut
T7 GlySer : T7 WT	1 : 100	1 : 20	1 : 44	1 : 91
Anreicherungsfaktoren		5	2,3	1,1
T7 GlySer-Wiedergewinnungsraten [%]		0,017	0,003	0,001
T7 GlySer : T7 WT	1 : 10	1 : 1,4	1 : 3,7	1 : 8,5
Anreicherungsfaktoren		7,1	2,7	1,2
T7 GlySer-Wiedergewinnungsraten [%]		0,0127	0,0016	0,0004

Tab. 3.4: Vergleich der Anreicherung nach Trypsinverdau in der rekonstituierten Probe und in einer Kontrolle ohne Pigment.

Die Phagenlysate (T7 WT und T7 GlySer) wurden wie in Kap. 2.5.4.1 hergestellt und durch Chloroform-Extraktion und Filtration gereinigt. Durch Mischen der beiden Lysate und Zugabe von 2 x Solubilisierungspuffer im Verhältnis 1 : 1 wurden die beiden Ausgangsmischungen hergestellt. Die Proben wurden durch Detergenswechsel rekonstituiert (ohne DTT; 1 µg/µl Chlorophyll; 0,4 µg/µl Xanthophyll; pH 9) bzw. einem Detergenswechsel ohne Pigmente unterzogen. Anschließend wurde ein Trypsinverdau durchgeführt: 30 min bei Raumtemperatur mit 0,1 mg/ml Trypsin (bzw. ohne Trypsin) und 1 mg/ml TPCK. Nach dem Trypsinverdau wurden die Proben zweimal durch ein Glyzerinkissen (45 µl 40 % Glyzerin in 50 mM Tris-HCl (pH 7,8); 100000 rpm A110-Airfugerotor) zentrifugiert. Die Pellets wurden in TBS (10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 0,5 M NaCl) mit 0,01 % SDS aufgenommen und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Immobilisierung auf einer beschichteten Protein G-Platte. Pro Vertiefung wurden ca. $1,5 \times 10^9$ pfu eingesetzt. Die Elution erfolgte mit 1 % SDS (10 mM Tris-HCl pH 7,8). Die Zahlen geben die Verhältnisse von Plaques mit Lhcb1-Signal zu Plaques ohne Lhcb1-Signal an. Aus dem Verhältnis der Ausgangsmischung und dem Verhältnis der jeweiligen Eluate wurden die Anreicherungsfaktoren errechnet. Der Anteil der aufgetragenen T7 GlySer Bakteriophagen, der in den Eluates wieder gefunden wurde, ist als Wiedergewinnungsrate in % angegeben.

Trotz der Reinigungsschritte und dem Pufferwechsel konnte für die unverdaute Kontrolle kein höherer Anreicherungsfaktor erreicht werden als in Kap. 3.1.2.4.2.3. Die Wiedergewinnungsraten der T7 GlySer-Phagen lagen in den unverdauten Proben dagegen um ca. Faktor 10 höher, was entsprechend auf eine höhere unspezifische Bindung zurück zu führen sein muss.

Die verdauten Proben zeigten generell niedrigere Anreicherungsfaktoren und einen um Faktor 3 reduzierten Phagentiter der Eluate, was sich in den niedrigen Wiederfindungsraten äußerte. Dennoch konnte in den Proben, die vor dem Trypsinverdau mit Pigmenten rekonstituiert worden waren, eine um Faktor 2 höhere Anreicherung beobachtet werden als nach einem Verdau ohne vorhergehende Rekonstitution. Nach Abb. 3.16 ist trotz Rekonstitution mit einem proteolytischen Abbau von etwa 80 % der rekonstituierten Fusionsproteine zu rechnen, die Anreicherungsfaktoren wurden jedoch nur um Faktor 2,2-2,6 reduziert.

Der Anreicherungsfaktor für stabile LHCIIB-Mutanten, die während des Trypsin-Verdau vollständig rekonstituiert vorliegen, sollte mit den Anreicherungsfaktoren der unverdauten Kontrollen in Tab. 3.4 vergleichbar sein, während instabile LHCIIB-Mutanten, die vollständig durch Trypsin abgebaut werden, mit der nicht-rekonstituierten, verdauten Probe in Tab. 3.4 zu vergleichen sind. Unter Selektionsbedingungen wäre für stabile LHCIIB-Mutanten demnach ein Anreicherungsfaktor von 4,5 bis 6 im Vergleich zu instabilen Mutanten zu erwarten.

Im Unterschied zu Kap. 3.1.2.4.2.3 wurde die Immobilisierung in Tab. 3.4 bei einer ca. dreifach höheren NaCl-Konzentration durchgeführt. Ein weiteres Experiment (Tab. 3.5) sollte klären, ob eine Reduktion des NaCl-Gehaltes während der Immobilisierung zu einer höheren Anreicherungsrate führt.

	Ausgangsmischung	Eluate
T7 GlySerSphI : T7WT	1 : 237	1 : 33
Anreicherungsfaktoren		7,2
T7 GlySerSphI-Wiedergewinnungsrate [%]		0,026
T7 GlySerSphI : T7WT	1 : 237	1 : 25
Anreicherungsfaktoren		9,5
T7 GlySerSphI-Wiedergewinnungsrate [%]		0,026

Tab. 3.5: Anreicherungsfaktor für T7 GlySerSphI bei 0,15 M NaCl.

Die Bakteriophagenlysate (T7 WT und T7 GlySerSphI) wurden hergestellt und rekonstituiert wie in Tab. 3.4 beschrieben. Ein Trypsinverdau wurde nicht durchgeführt. Nach der Rekonstitution wurden die Proben wie in Tab. 3.4 beschrieben gereinigt und immobilisiert. Immobilisierungspuffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 1,5 M NaCl; 0,01 % SDS. Pfu pro Vertiefung: $1,5 \times 10^9$. Die Elution erfolgte ebenfalls wie gehabt. Die Zahlen geben die Verhältnisse von Plaques mit Lhcb1-Signal zu Plaques ohne Lhcb1-Signal an. Aus dem Verhältnis der Ausgangsmischung und dem Verhältnis der jeweiligen Eluate wurden die Anreicherungsfaktoren errechnet. Der Anteil der aufgetragenen T7 GlySer Bakteriophagen, der in den Eluaten wieder gefunden wurde, ist als Wiedergewinnungsrate in % angegeben. Ausgehend von einer Mischung wurden zwei parallele Anreicherungsexperimente durchgeführt.

Wie aus Tab. 3.5 zu entnehmen, konnten die Anreicherungsfaktoren durch geringere NaCl-Konzentrationen nur unwesentlich gesteigert werden. Der Anreicherungsfaktor aus Tab. 3.2 in Kap. 3.1.2.4.2.2 blieb nach wie vor unerreicht.

Ausgehend von einer theoretisch möglichen Anreicherung stabiler Mutanten gegenüber instabilen Mutanten um Faktor 4,5-6 (siehe oben), wurden, wie in Kap. 3.2 beschrieben, Selektionsexperimente durchgeführt. Durch fünf hinter einander geschaltete Selektionsrunden sollten stabile LHCIIB-Mutanten gegenüber instabilen Mutanten um Faktor $4,5^5$ bis 6^5 angereichert werden.

3.2 Selektionen

In Kap. 3.1.2.4.3 wurde gezeigt, dass T7 Lhcb1-Phagen, deren Lhcb1-Proteine rekonstituiert vorlagen, einen Selektionsvorteil gegenüber den nicht rekonstituierten Lhcb1-Phagen hatten, wenn vor einer Immobilisierung über Anti-Lhcb1-Antikörper mit Trypsin verdaut wurde. Im Vergleich konnten für rekonstituierte Lhcb1-Phagen ca. 2-fach höhere Anreicherungsraten beobachtet werden als für die nicht rekonstituierte Kontrolle.

Wie in Kapitel 3.1.2.4.3 dargelegt, sollten stabile LHCIIB-Mutanten, die durch die Rekonstitution vollständig vor einem Abbau durch Trypsin geschützt sind, Anreicherungsfaktoren zwischen 5 und 7 zeigen, während instabile Mutanten mit der nicht-rekonstituierten Probe vergleichbar sind und kaum eine Anreicherung zeigen sollten (Faktor 1,1-1,2 in Tab. 3.4).

Man kann daher davon ausgehen, dass sich stabile Mutanten maximal um ca. Faktor 5 im Vergleich zu instabilen Mutanten anreichern können. Durch die Durchführung mehrerer Selektionsrunden, wobei jeweils die eluierten Mutanten der vorhergehenden Runde in die

nächste Runde eingesetzt werden, potenzieren sich die Anreicherungsfaktoren, so dass bei fünf Selektionsrunden mit einer Anreicherungsrate von ca. 5^5 zu rechnen ist.

Im Folgenden sind mehrere Experimente dargestellt, in denen versucht wurde, ausgehend von verschiedenen Mutantenbibliotheken (Tab. 3.7) eine Anreicherung stabiler LHCIIB-Mutanten zu erreichen.

3.2.1 Herstellung der Mutantenbibliotheken

Durch eine spezielle PCR-Reaktion (Shafikhani et al., 1997; Heinemann et al., 1999) wurden zufällige Mutationen in das *Lhcb1*-Gen eingeführt. Dabei wurde die Fehlerrate der PCR-Polymerase durch die Zugabe von Mn^{2+} -Ionen und durch eine 5-fach höhere Konzentration der Deoxynukleosidtriphosphate dCTP/dTTP gegenüber dATP/dGTP gesteigert, was zu Nukleotidaustauschen im amplifizierten Fragment führen sollte.

Die PCR-Primer wurden so gewählt, dass lediglich der C-terminale Abschnitt ab P147 mutiert werden konnte. Diese Einschränkung erschien notwendig, da eine starke Verkürzung des exprimierten Proteins durch eine Stopmutation zu einem beschleunigten Generationszyklus führen könnte (vgl. Kap. 3.1.2.4.2.1). Bei der Durchführung mehrerer hintereinander geschalteter Selektionsrunden waren Amplifikationen der selektierten Mutanten unumgänglich, weshalb Mutanten mit verkürztem Generationszyklus einen Selektionsvorteil hätten.

Die Beschränkung der Mutagenese auf den C-terminalen Abschnitt ab P147 erforderte die Generation einer neuen *SphI*-Schnittstelle. Dabei musste I143 durch ein Histidin ersetzt werden. Der Nachweis des Fusionsproteins nach Rekonstitution und Trypsinverdau (Abb. 3.16) gelang mit dieser Mutante jedoch genauso wie für T7 GlySer (nicht gezeigt).

Shafikhani et al., 1997 beobachteten in der Anwesenheit von 0,5 mM $MnCl_2$ eine Nukleotidaustauschrate von 0,49 %. Allerdings wurden die Nukleotide A und T häufiger mutiert als C und G, weshalb ein anderer GC-Gehalt der Zielsequenz zu einer veränderten Mutationsrate führen sollte. In früheren Arbeiten (Heinemann et al., 1999) wurde bei der Mutagenese der *Lhcb1*-cDNA ebenfalls eine Fehlerrate von ungefähr 0,49 % beobachtet.

Der mutierte Abschnitt der *Lhcb1*-cDNA hatte eine Länge von 276 bp. Pro Amplifikat wurden daher 1,35 Nukleotidaustausche erwartet. Um die Anzahl der Nukleotidaustausche zu erhöhen, wurden z. T. mehrere Mutagenese-PCR-Runden durchgeführt, wobei das Produkt der vorhergehenden Runde als Template in eine nachfolgende PCR eingesetzt wurde (Shafikhani et al., 1997).

Abb. 3.19 zeigt beispielhaft die Produkte von drei Mutagenese-PCR-Runden. Dabei wurden immer andere Primerpaare verwendet, um Probleme durch degenerierte Primer-Bindestellen zu vermeiden (Heinemann, 2000).

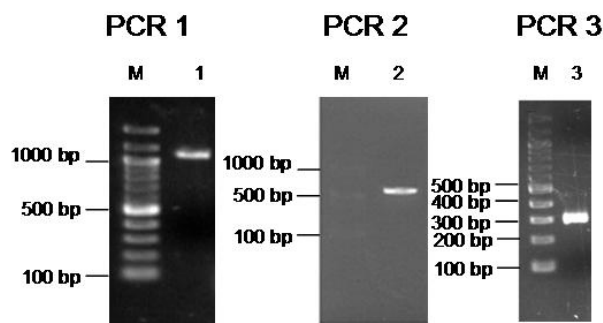


Abb. 3.19: Produkte von drei aufeinanderfolgenden Mutagenese-PCR-Reaktionen.

Die Mutagenese-PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 20 mM Tris/HCl, pH 8,55; 16 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2 mM MgCl_2 ; 0,25 mM dATP/dGTP; 1,25 mM dCTP/dTTP; jeweils 0,5 μM Primer; 0,5 mM MnCl_2 ; 25 mU/ μl *Taq*-DNA-Polymerase. PCR-Programm: 35 Zyklen; 60 sec 92°C; 60 sec 52°C; 90 sec 72°C. Jeweils 0,01 nM des gereinigten Produktes der vorhergehenden PCR wurde als Template in die nächste PCR eingesetzt. Template in PCR 1: 0,015 pM GlySerSphI-Plasmid-DNA. Primerpaare: DS23⁺/DS340⁻ (PCR 1); AB80-667/DS178⁻ (PCR 2); SphI_VM/XmaI_VM (PCR 3). Die PCR-Produkte wurden über eine Agarosegelelektrophorese aufgereinigt. Aufgetragen wurde jeweils 1/10 des gereinigten Produktes nach PCR 1 und 2. Nach PCR 3 wurde das Produkt mit den Restriktionsenzymen *SphI* und *XmaI* verdaut. 1/10 des gereinigten Produktes wurde aufgetragen. M: 100 bp-Leiter.

	Primer-Paar	Länge des Produktes
PCR 1	DS23 ⁺ /DS340 ⁻	1092 bp
PCR 2	AB80-667/DS178 ⁻	550 bp
PCR 3	SphI_VM/XmaI_VM	314 bp
PCR 3 nach Verdau mit <i>SphI</i> und <i>XmaI</i>		288 bp

Tab. 3.6: Verwendete Primer-Paare und erwartete Produktlängen.

Nach jeder PCR war ein Produkt der erwarteten Länge zu beobachten (Abb. 3.19; Tab. 3.6). Unabhängig von der Anzahl der Mutagenese-PCR-Runden wurde die letzte PCR mit dem Primer-Paar SphI_VM und XmaI_VM durchgeführt, um eine Degeneration der Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *SphI* und *XmaI* durch Nukleotidaustausche zu vermeiden.

Die Produkte der Mutagenese-PCR wurden in das Bakteriophagen genom (Vektor: T7GlySerSphI) ligiert. Dazu wurden sowohl die PCR-Produkte als auch die Vektor-DNA mit den Restriktionsenzymen *SphI* und *XmaI* verdaut und anschließend dephosphoryliert. Die beiden Vektorarme der T7 GlySerSphI-DNA wurden nicht voneinander getrennt, sondern gemeinsam mit dem mutierten Produkt in eine Ligationsreaktion eingesetzt. Die Ligationsprodukte wurden anschließend in die Capside verpackt (*In vitro-Packaging*).

In einem Plaque-Assay wurde die Anzahl der Bakteriophagen nach der Verpackungsreaktion bestimmt (Tab. 3.7). Der Hintergrund durch unverdaute T7 GlySerSphI-DNA wurde bestimmt, indem eine Ligationsreaktion ohne Insert durchgeführt und die Produkte ebenfalls in Bakteriophagencapside verpackt wurden (Tab. 3.7).

Für Selektionsexperiment 1 und 2 wurden die Produkte derselben Mutagenese-PCR verwendet, die jedoch in unabhängigen Experimenten in den Phagenvektor ligiert und in die Capside verpackt wurden. Der Hintergrund der Mutantenbibliothek, die in Selektionsexperiment 1 verwendet wurde, lag bei 30 %. Die Vektor DNA wurde ein zweites Mal verdaut und dephosphoryliert, bevor sie in Selektionsexperiment 2 und 3 verwendet wurde. Dadurch konnte der Hintergrund auf 10-14 % gesenkt werden.

	Anzahl der Bakteriophagen	Hintergrund durch unverdaute T7 GlySerSphI-DNA
Selektionsexperiment 1	$1,7 \times 10^5$	30 %
Selektionsexperiment 2	$1,2 \times 10^5$	10 %
Selektionsexperiment 3	$8,4 \times 10^4$	14 %

Tab. 3.7: Umfang der Mutantenbibliotheken und Hintergrund durch Vektor-DNA.

Nach der Mutagenese-PCR wurden die *SphI-XmaI*-Fragmente in die T7 GlySerSphI-Vektor-DNA ligiert. Zur Bestimmung des Hintergrundes wurde eine Ligation der verdauten, dephosphorylierten Vektor-DNA ohne *SphI-XmaI*-Fragment durchgeführt. Die Ligationsprodukte wurden in Bakteriophagencapside verpackt. In einem Plaque Assay wurde die Gesamtanzahl der Bakteriophagen bestimmt.

3.2.2 Durchführung der Selektionen

Ausgehend von den oben beschriebenen Mutantenbibliotheken wurden Selektionsexperimente durchgeführt, deren prinzipieller Ablauf bereits in Kap. 3.1.2.4 beschrieben wurde. Die Lhcb1-Proteine auf den Bakteriophagenhüllen wurden durch Detergenswechsel rekonstituiert und anschließend einem Trypsinverdau unterzogen. Nach zwei Reinigungsschritten durch Pelletierung, wurden die Bakteriophagen zur Immobilisierung auf Mikrotiterplatten aufgetragen, die mit Anti-Lhcb1-Antikörper beschichtet waren.

Voraussetzung für eine erfolgreiche Selektion stabiler LHCIIB-Mutanten ist, dass nur diese zum Zeitpunkt des Trypsin-Verdau als Pigment-Protein-Komplexe vorliegen. Da unmutierte, rekonstituierte Lhcb1-Phagen nach Trypsin-Verdau noch eine 2-2,3-fach höhere Anreicherungsrate zeigten als die nicht rekonstituierte Kontrolle, wurde die Stringenz während der Selektion gesteigert. In Selektionsexperiment 1 wurden zwei verschiedene Bedingungen für den Trypsin-Verdau gewählt, der entweder bei erhöhter Temperatur (37°C) oder bei gesteigerter SDS-Konzentration (0,2 %) durchgeführt wurde.

Da sich in den Anreicherungsexperimenten in Kap. 3.1.2.4.3 Hinweise auf einen möglichen Vorteil einer geringeren Salzkonzentration während der Immobilisierung ergeben hatten, wurden in Selektionsexperiment 1 außerdem zwei verschiedene NaCl-Konzentrationen während der Immobilisierung getestet.

Bevor die in Kap. 3.2.1 beschriebenen Mutantenbibliotheken in die Selektionsexperimente eingesetzt werden konnten, mussten die Bakteriophagen zunächst amplifiziert werden. Nach einer Verpackung der Ligationsprodukte in die Bakteriophagen-Capside sind noch keine p10-Lhcb1-Fusionsproteine in der Phagenhülle vorhanden. Erst in einem nachfolgenden Amplifizierungsschritt werden diese Fusionsproteine in den bakteriellen Wirtszellen produziert und in die Capside eingebaut. Die Mutantenbibliotheken wurden um Faktor 10^5 amplifiziert und ca. 10^{10} Bakteriophagen wurden in die Selektionsexperimente eingesetzt.

Der Phagentiter vor dem Auftrag auf die Mikrotiterplatte wurde ebenfalls bestimmt und lag um ca. Faktor 10^2 unter der ursprünglich eingesetzten Phagenmenge. Es wird vermutet, dass sich größere Verluste während der beiden Reinigungsschritte ereigneten.

Mit weiteren Verlusten ist während der Immobilisierung zu rechnen. In bisherigen Experimenten konnten nach einer Immobilisierung von rekonstituierten, unverdauten T7 Lhcb1-Phagen nur ca. 0,013 – 0,026 % der ursprünglich eingesetzten T7 Lhcb1-Phagen wieder gewonnen werden (Kap. 3.1.2.4.3). Da angenommen wurde, dass dieser große Verlust auch auf eine unvollständige Elution spezifisch gebundener T7 Lhcb1-Phagen durch 1 % SDS zurückzuführen war, wurde für die Selektionsexperimente die Elution durch *In situ*-Amplifikation gewählt, die eine vollständigere Elution immobilisierter Bakteriophagen ermöglichen sollte.

In Kap. 3.1.2.4.2.1 konnte nach Elution durch Lyse nur ein vergleichsweise geringer Anreicherungsfaktor bestimmt werden, der allerdings vermutlich auf eine Anreicherung der schneller wachsenden T7 WT-Phagen während der Amplifikation zurückzuführen war. Während der Selektion sollten dagegen nur Bakteriophagen vorliegen, die mindestens 2/3 des Lhcb1-Proteins exprimieren, weshalb keine drastischen Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit erwartet wurden.

Wie oben erwähnt, wurden mehrere aufeinander folgende Selektionsrunden durchgeführt, um eine Anreicherung stabiler Lhcb1-Mutanten zu erreichen. Um die enormen Verluste an Bakteriophagen während der Selektionsprozedur auszugleichen, wurden die eluierten Bakteriophagen vor jeder Selektionsrunde amplifiziert und aufkonzentriert, um eine Ausgangsmenge von 10^{10} Bakteriophagen zu erreichen.

Nach der Durchführung der Selektionen musste die Stabilität der Pigment-Protein-Komplexe beurteilt werden. Dazu wurde die Lhcb1-cDNA einiger Bakteriophagen aus den Eluaten der fünften Selektionsrunde in einen bakteriellen Expressionsvektor umkloniert, die Lhcb1-Proteine wurden überexprimiert und mit Pigmenten rekonstituiert. Eine Messung des Energietransfers von Chl *b* auf Chl *a*, sowie eine Auftrennung der rekonstituierten Lhcb1-Proteine in einer schwach denaturierenden Gelelektrophorese sollten einen ersten Eindruck der Stabilität selektierter Mutanten vermitteln.

3.2.2.1 Selektionsexperiment 1

Ausgehend von einer Mutantenbibliothek, die durchschnittlich 1,35 Nukleotidaustausche pro Mutante enthalten sollten, wurden vier Selektionsexperimente unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Dabei wurden die Bedingungen während des Trypsinverdau variiert, der in einem Fall bei 37°C und im anderen Fall in der Gegenwart von 0,2 % SDS bei Raumtemperatur durchgeführt wurde. Außerdem wurden die Bakteriophagen entweder in Gegenwart von 0,15 M oder 0,5 M NaCl immobilisiert.

Nach der letzten Elution wurde ein Teil der eluierten Bakteriophagen auf einem Bakterienrasen ausplattiert. Material aus je fünf Plaques der unter verschiedenen Bedingungen selektierten Bakteriophagen wurde in eine PCR eingesetzt, um den evtl. mutierten Abschnitt der Lhcb1-Sequenz zu amplifizieren.

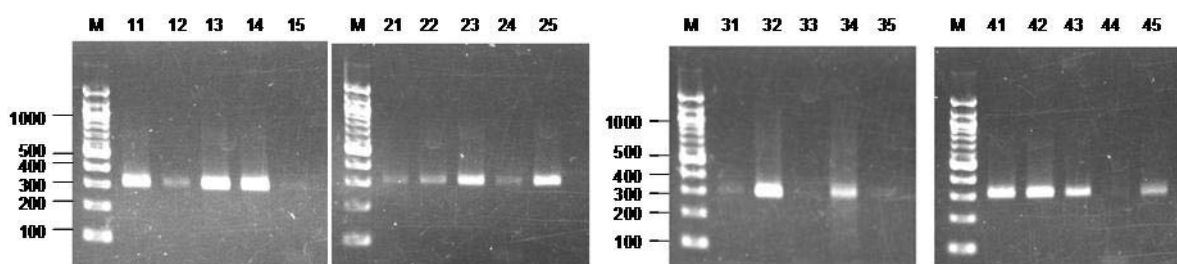


Abb. 3.20: PCR-Produkte der selektierten Mutanten.

Plaque-Material aus je fünf Plaques der unter verschiedenen Bedingungen (siehe Abb. 3.21) selektierten Bakteriophagen wurde in die PCR eingesetzt. Amplifiziert wurde mit den Primern SphI_VM und T7_His, die den mutierten Bereich der Lhcb1-Sequenz einschließen und die Restriktionsschnittstellen *Bst*EII bzw. *Xma*I enthalten. Nach der PCR-Reaktion wurden die Produkte mit Phenol extrahiert und durch Isopropanol gefällt. Die Produkte wurden in H₂O aufgenommen und mit *Xma*I verdaut. Nach einer erneuten Phenolextraktion und Isopropanolfällung wurden die Produkte mit *Bst*EII verdaut. Es folgte eine letzte Aufreinigung über Phenolextraktion und Isopropanolfällung, danach wurden die Produkte in 5 µl H₂O aufgenommen. 1 µl wurde auf ein Agarosegel aufgetragen. M: 100 Basenpaar-Leiter. Die Zahlen bezeichnen die Mutanten, die nach der Selektionsbedingung (siehe Abb. 3.21) benannt (erste Ziffer) und mit einer fortlaufenden Nummerierung (zweite Ziffer) versehen wurden.

Wie in Abb. 3.20 zu sehen, waren die Ausbeuten der PCR sehr unterschiedlich. In allen Fällen waren jedoch zumindest noch schwache Signale bei der erwarteten Produktlänge (300 bp) zu erkennen. Die amplifizierten Produkte wurden in einen Lhcb1-Expressionsvektor (C3.2h) ligiert, der mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und dephosphoryliert worden war. Nach der Transformation wurden die Proteine überexprimiert.

Eine Energietransfermessung nach einer Rekonstitution durch SDS-Verdünnung sollte einen ersten Eindruck der Komplex-bildenden Eigenschaften der selektierten Mutanten liefern. Dazu wurde ein Fluoreszenzspektrum nach gezielter Anregung von Chl *b* aufgenommen. Je höher die Fluoreszenz von Chl *a*, desto besser ist der Energietransfer. Zur weiteren Beurteilung der Stabilität wurden die rekonstituierten Komplexe in einer schwach denaturierenden Gelelektrophorese aufgetrennt. Dabei trennt sich das ungefaltete Apoprotein von der Pigment-Protein-Komplexbande. Der Anteil von Pigment-Protein-Komplex und ungefaltetem Protein erlaubt Rückschlüsse auf die Stabilität der Pigment-Protein-Komplexe (siehe Kap. 3.2.3.1).

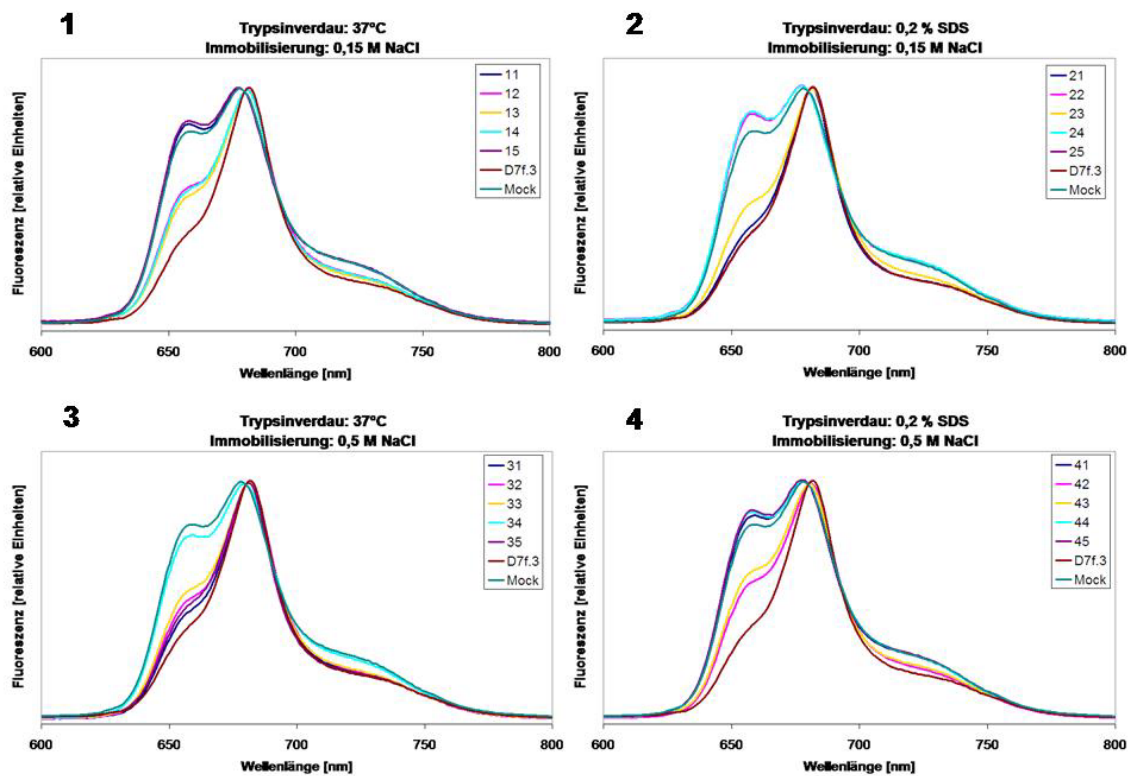


Abb. 3.21: Energietransfermessung selektierter Mutanten.

Nach Durchführung einer Selektion wie in Kap. 3.2.2 beschrieben, wurden pro Selektionsbedingung jeweils fünf Mutanten ausgewählt und in einen bakteriellen Lhcb1-Expressionsvektor umkloniert. Die Proteine wurden in einem 5 ml-Ansatz überexprimiert und durch SDS-Verdünnung rekonstituiert (0,11 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Chlorophyll, 0,014 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Xanthophyll; pH 9). Anschließend wurde ein Fluoreszenz-Emissionspektrum nach Anregung bei 470 nm in einer „Front-Face“-Messung aufgenommen. Die vier Teilbilder zeigen die jeweils fünf Mutanten einer Selektionsbedingung (im Diagrammtitel angegeben) im Vergleich zu einer WT-Lhcb1-Kontrolle (D7f.3) und einer Kontrolle ohne Pigmente (Mock). Die Spektren wurden auf gleiche Fluoreszenz bei 680 nm normiert.

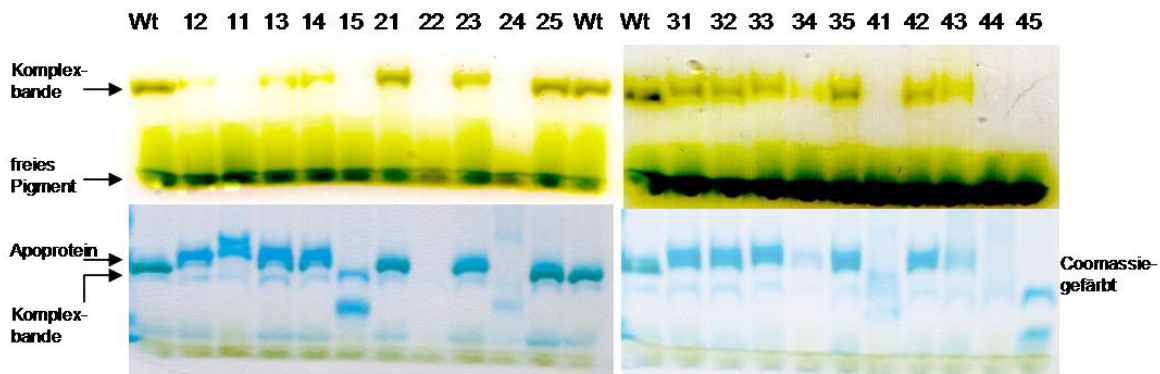


Abb. 3.22: Stabilität der selektierten Mutanten während einer schwach denaturierenden Gelelektrophorese.

Nach der Energiemessung (Abb. 3.21) wurden die Komplexe in einer Deriphat-Gelelektrophorese auf einem 10 % Polyacrylamid-Gel unter schonenden Bedingungen aufgetrennt. Pro Tasche wurden 2,4 µg Protein aufgetragen. Im unteren Teil der Abbildung sind die Gele nach einer Coomassie-Färbung zu sehen. Wt: Wildtyp-Lhcb1 (D7f.3).

Keine der Mutanten zeigte einen besseren Energietransfer als die unmutierte Lhcb1-Kontrolle, in einigen Proben konnte jedoch ein deutlich reduzierter Energietransfer beobachtet werden. Proben mit niedrigerem bzw. keinem Energietransfer zeigten auch deutlich schwächere bzw. keine grünen Komplexbanden nach der schwach denaturierenden Gelelektrophorese.

Nach der Coomassie-Färbung wurde sichtbar, dass die Proben ohne Energietransfer bzw. ohne grüne Banden entweder keine prominente Proteinbanden enthielten (22, 24, 41 und 44) oder ein Protein vorlag, das vermutlich durch eine Stopmutation verkürzt war (15 und 45). Eine Ausnahme bildete Mutante 11, die weder Energietransfer noch eine grüne Komplexbande zeigte, und deren Laufverhalten im schwach denaturierenden Gel eher auf eine Verlängerung des Proteins schließen ließ.

Alle Mutanten hatten ein etwas höheres Molekulargewicht als die unmutierte Kontrolle, was durch den C-terminalen His₆-Tag zu erklären ist. Bis auf Mutante 11 zeigten alle Mutanten der Selektionsbedingung 1 (Trypsinverdau bei 37°C; Immobilisierung bei 0,15 M NaCl) Energietransfer, der jedoch im Vergleich zur unmutierten Kontrolle deutlich reduziert war (Abb. 3.21). Daneben zeigten sich für diese Mutanten deutlich schwächere grüne Komplexbanden sowie ein höherer Apoprotein-Anteil (Abb. 3.22).

Mutanten der Selektionsbedingung 2 (Trypsin-Verdau bei 0,2 % SDS; Immobilisierung bei 0,15 M NaCl) verhielten sich sehr ähnlich wie die unmutierte Kontrolle. Alle Mutanten der Selektionsbedingung 3 (Trypsin-Verdau bei 37°C; Immobilisierung bei 0,5 M NaCl) zeigten eine grüne Komplexbande nach der schwach denaturierenden Gelelektrophorese. Mutante 34 zeigte keinen Energietransfer, eine grüne Komplexbande war jedoch vorhanden, was vermutlich durch den niedrigeren Proteingehalt dieser Probe zu erklären ist.

Die beiden unverkürzten Proteine aus Bedingung 4 (Trypsinverdau bei 0,2 % SDS; Immobilisierung bei 0,5 M NaCl) zeigten beide reduzierten Energietransfer, jedoch deutlich sichtbare Komplexbanden nach der schwach denaturierenden Gelelektrophorese.

Nach der Häufigkeit des Auftretens instabiler Mutanten erschien Bedingung 1 (Trypsinverdau bei 37°C; Immobilisierung bei 0,15 M NaCl) ungeeignet zur Selektion stabiler Mutanten. Die Proteine, die unter diesen Bedingungen selektiert worden waren, wurden nicht weiter behandelt. Verschiedene Mutanten aus den restlichen drei Selektionsbedingungen wurden sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Tab. 3.8 zusammengefasst. Die

Sequenzen sind im Anhang zu finden, bezeichnet mit „BP1“ und der jeweiligen Mutanten-Nummer.

Mutante	Codon-Position	Nukleotidaustausche	Aminosäure-Austausche
23		-	-
25	P205 ab P230 veränderte Sequenz	CCT>CCC	-
31		-	-
32	Leu176	TTG>CTG	-
33	E207	GAG>GGG	E207G
34		-	-
35		-	-
42	E207	GAG>GGG	E207G
43	E207 ab His236 veränderte Sequenz	GAG>GGG	E207G

Tab. 3.8: Austausch in sequenzierten Mutanten.

Die Plasmid-DNA der genannten Mutanten wurde extrahiert, gereinigt und mit Primer S2 sequenziert. Die Auftrennung der Produkte der Sequenzierreaktion wurde von einem kommerziellen Anbieter (Genterprise, Mainz) durchgeführt.

In den sequenzierten Mutanten konnte nur ein Aminosäureaustausch beobachtet werden, der allerdings dreimal auftauchte: Glutamat an der Position 207, in der C-proximalen amphiphilen Helix, wurde in drei Mutanten durch ein Glycin ersetzt. Diese Mutation wurde in zwei unabhängigen Selektionsexperimenten gefunden, die allerdings mit derselben Ausgangsbibliothek durchgeführt worden waren.

Da es keinen Grund zu der Annahme gibt, diese spezielle Mutation hätte bereits in der Ausgangsbibliothek in großer Anzahl vorgelegen, deutet das Auftreten dieser Mutation in zwei unabhängigen Selektionsexperimenten auf eine Anreicherung hin. Die Stabilität dieser Mutante wurde daher eingehend untersucht (Kap. 3.2.3).

Neben der Mutation E207G wurden zwei weitere Nukleotidaustausche beobachtet, die aufgrund des degenerierten genetischen Codes jedoch nicht zu Aminosäureaustauschen führten.

In zwei Fällen wurde eine veränderte Aminosäuresequenz am C-Terminus des Proteins beobachtet, die durch Generation einer neuen *XmaI*-Restriktionsschnittstelle im C-terminalen Bereich der Lhcb1-Sequenz zustande kam.

3.2.2.2 Selektionsexperiment 2

Die Amplifikate der Mutagenese-PCR, die bereits zur Herstellung der Mutantenbibliothek für Selektionsexperiment 1 verwendet worden waren, wurden in T7 GlySerSphI-Vektor ligiert, der ein zweites Mal verdaut und dephosphoryliert worden war, um den Hintergrund an unmutierten Lhcb1-Proteinen zu senken.

Wie unter Bedingung 2 in Selektionsexperiment 1, wurde der Trypsinverdau bei 37°C und die Immobilisierung in Anwesenheit von 0,5 M NaCl durchgeführt. Außerdem wurde in diesem Fall während der Rekonstitution 1 mM DTT zugegeben, um die Ausbeute an Pigment-Protein Komplexen zu erhöhen.

Wie oben geschildert, wurden die Bakteriophagen nach der letzten Elution auf einem Bakterienrasen ausplattiert und zur Amplifikation des Lhcb1-Fragmentes wurde Plaques-Material in eine PCR-Reaktion eingesetzt. Die 20 PCR-Produkte wurden, wie oben geschildert, in bakterielle Lhcb1-Expressionsvektoren umklont. In zwei Fällen (5 und 14) konnte keine Überexpression erreicht werden, diese Mutanten-Nummern fehlen daher in Abb. 3.23.

Die Überexpression der Mutanten, die Energiemessungen und die schwach denaturierende Gelelektrophorese wurden von Vasileios K. im Rahmen eines Laborpraktikums unter Anleitung der Autorin durchgeführt.

Energietransfer der Mutanten aus Selektionsexperiment 2

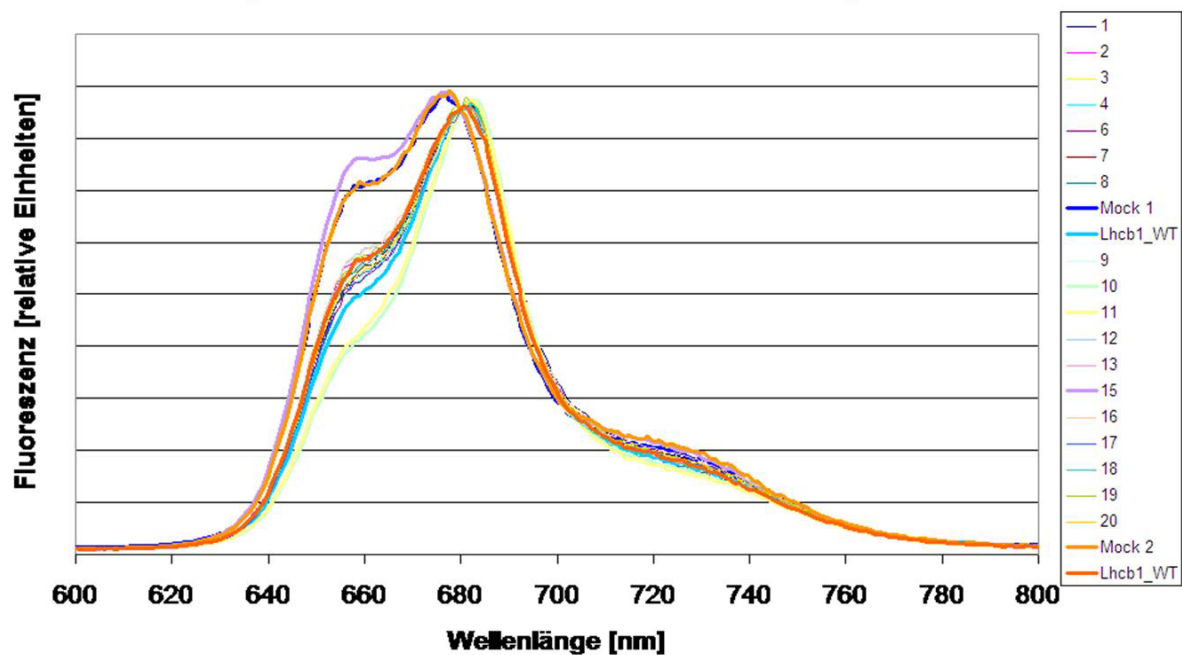


Abb. 3.23: Energietransfer der Mutanten aus Selektionsexperiment 2.

Nach Durchführung einer Selektion mit Mutanten nach einer Mutageneserunden, wie in Kap. 3.2.2 beschrieben (Rekonstitution mit 1 mM DTT; Trypsinverdau bei 37°C; Immobilisierung und Waschschriffe mit 0,5 M NaCl), wurden die Lhcb1-Gene von 20 T7 Lhcb1-Mutanten durch PCR amplifiziert (vgl. Abb. 3.20) und in C3.2h umklont. 20 Transformanten wurden ausgewählt und die Proteine wurden in einem 5 ml-Ansatz überexprimiert. In den Transformanten 5 und 14 konnte keine Überexpression erreicht werden. Die übrigen Proteine wurden durch SDS-Verdünnung (0,11 µg/µl Chlorophyll, 0,044 µg/µl Xanthophyll; pH 9) rekonstituiert. Anschließend wurde ein Fluoreszenz-Emissionspektrum nach Anregung bei 470 nm in einer „Front-Face“-Messung aufgenommen. 2 Kontrollen ohne Protein wurden als Mock 1 und 2 bezeichnet. Die Spektren wurden auf gleiche Fluoreszenz bei 680 nm normiert.

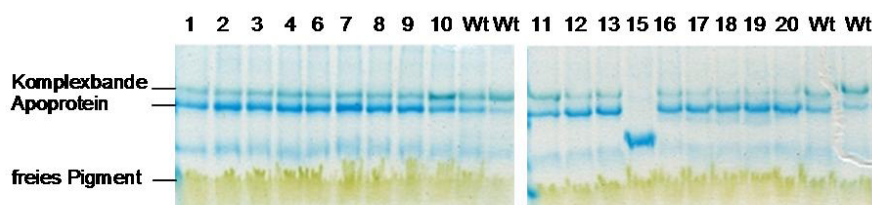


Abb. 3.24: Rekonstituierte Mutanten des zweiten Selektionsexperimentes, aufgetrennt in einer schwach denaturierenden Gelelektrophorese.

Nach der Energiemessung (Abb. 3.23) wurden die Komplexe in einer Deriphat-Gelelektrophorese auf einem 15 % Polyacrylamid-Gel unter schonenden Bedingungen (4°C, max. 100 V) aufgetrennt. Pro Tasche wurden 2,4 µg Protein aufgetragen. Die Gele wurden mit Coomassie gefärbt. Wt: Lhcb1-Wildtyp (C3.2h).

Die Auftrennung der Komplexbande und der Bande des ungefalteten Apoproteins war deutlich besser als in Abb. 3.22, was auf die höhere Polyacrylamidkonzentration der Gele zurückzuführen ist. Allerdings zeigten sich für die unmutierte Kontrolle deutlich schwächere Komplexbanden als in Abb. 3.22.

Von den 18 überexprimierten Lhcb1-Mutanten war lediglich ein Protein vermutlich durch ein induziertes Stopcodon verkürzt und zeigte weder Energietransfer noch eine grüne Komplexbande nach der schwach denaturierenden Gelelektrophorese. Zwei Mutanten, Nr. 10 und Nr. 11, zeigten einen besseren Energietransfer und einen höheren Komplexbandenanteil als die unmutierten Kontrollen. Die Sequenzierung ergaben jedoch, dass keine Mutationen vorlagen (nicht gezeigt). Im Falle von Mutante Nr. 10 handelte es sich um religierten C3.2h-Vektor.

Da sich für die restlichen Mutanten keine Anzeichen einer verbesserten Stabilität ergaben, wurde auf weitere Sequenzierungen verzichtet.

3.2.2.3 Selektionsexperiment 3

In einem weiteren Selektionsexperiment wurde eine Mutantenbibliothek verwendet, die in drei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen hergestellt worden war. Die Mutageneserate sollte daher bei 1,47 % liegen und in den amplifizierten Fragmenten wurden durchschnittlich 4,05 Nukleotidaustausche erwartet. Die Selektion wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, wie Selektionsexperiment 2. Nach der letzten Elution wurde in diesem Fall auf ein Ausplattieren der einzelnen Bakteriophagen verzichtet. 10^4 Bakteriophagen wurden in eine PCR-Reaktion eingesetzt.

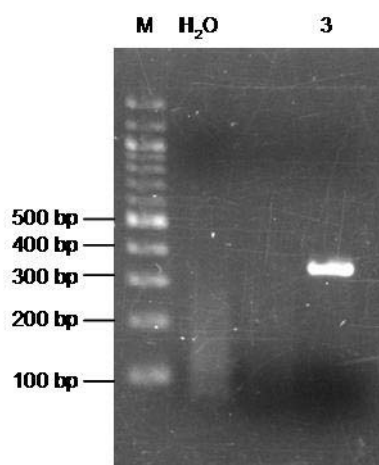


Abb. 3.25: Produkt der PCR mit 10^4 selektierten Lhcb1-Phagen als Template.

10^4 Bakteriophagen aus dem Eluat der 5. Selektionsrunde wurden als Template in die PCR-Reaktion eingesetzt. PCR-Bedingungen: 10 mM Tris/HCl, pH 8,8; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 25 mM dNTP; 0,1 μM Primer AB80-667; 0,1 μM T7His. Nach 5 min 80°C wurden 5 mU/μl *Taq*-DNA-Polymerase zugegeben. PCR-Programm: 35 Cyclen: 50 sec 94°C, 1 min 50°C, 1 min 72°C. Zusätzlich wurde eine Kontroll-PCR ohne Template durchgeführt. 2/5 der Kontroll-PCR und 1/10 der Phagen-PCR wurden aufgetragen. M: 100 bp-Leiter; H₂O: Kontrolle ohne Template; 3: Phagen-PCR.

Das Amplifikat wurde mit den Restriktionsenzymen *Bst*EII und *Xma*I verdaut und in den dephosphorylierten Expressionsvektor ligiert. Die Proteine von 22 Transformanten wurden überexprimiert, wobei für 3 Transformanten keine Inclusion Bodies erhalten werden konnten.

Die Überexpression der Mutanten, die Energietransfermessungen und die schwach denaturierende Gelelektrophorese wurden von Vasileios K. im Rahmen eines Laborpraktikums unter Anleitung der Autorin durchgeführt.

Energietransfer der Mutanten aus Selektionsexperiment 3

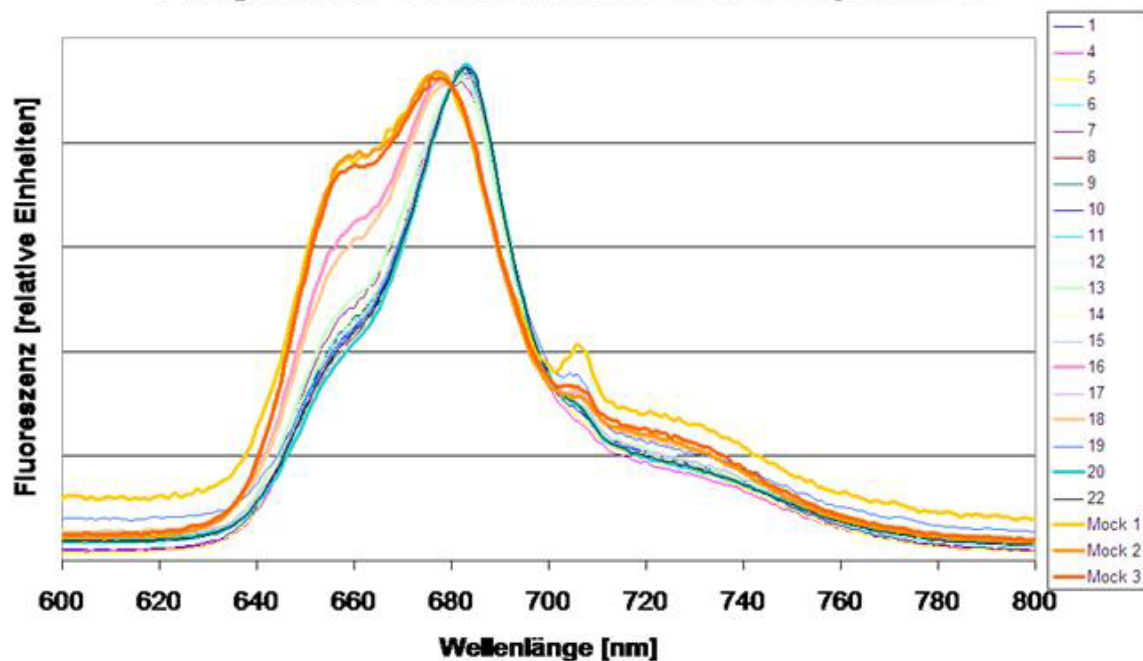


Abb. 3.26: Energietransfer der Mutanten aus Selektionsexperiment 3.

Nach Durchführung einer Selektion mit Mutanten nach drei Mutageneserunden, wie in Kap. 3.2.2 beschrieben (Trypsinverdau bei 37°C; Immobilisierung und Waschschrte mit 0,5 M NaCl), wurden die Lhcb1-Gene durch PCR amplifiziert und in *E. coli* umklontiert. 22 Transformanten wurden ausgewählt und die Proteine wurden in einem 5 ml-Ansatz überexprimiert. In den Transformanten 2, 3 und 21 konnte keine Überexpression erreicht werden. Die übrigen Proteine wurden durch SDS-Verdünnung (0,11 µg/µl Chlorophyll, 0,044 µg/µl Xanthophyll) rekonstituiert. Anschließend wurde ein Fluoreszenz-Emissionspektrum nach Anregung bei 470 nm in einer „Front-Face“-Messung aufgenommen. Mutanten 1, 7, 8, 9, 10, 13 und 20 entsprechen der Wildtyp-Aminosäuresequenz und können zum Vergleich herangezogen werden. 3 Kontrollen ohne Protein wurden als Mock 1-3 bezeichnet. Die Spektren wurden auf die gleiche Fluoreszenz bei 680 nm normiert.

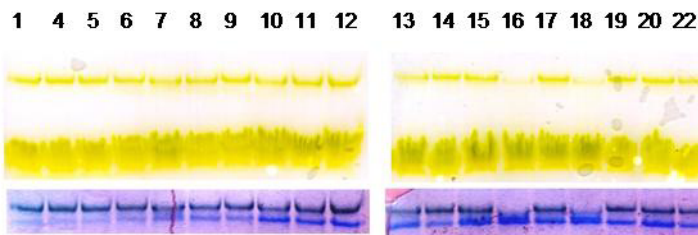


Abb. 3.27: Dreifach mutierte Proteine der dritten Selektion auf schwach denaturierenden Gelen.

Nach der Energietransfermessung (Abb. 3.26) wurden die Komplexe in einer Dieriphat-Gelelektrophorese auf einem 15 % Polyacrylamid-Gel unter schonenden Bedingungen (4°C, max. 100 V, dunkel) aufgetrennt. Pro Bahn wurden 2,4 µg Protein aufgetragen. Im unteren Teil der Abbildung sind die Gele nach einer Coomassie-Färbung zu sehen.

Keines der Lhcb1-Proteine zeigte einen besseren Energietransfer oder einen höheren Anteil der Pigment-Protein-Komplexbande als die unmutierte Kontrolle. Zwei der Proteine (Nr. 16 und 18) waren aber deutlich instabiler als der Wildtyp, sie zeigten deutlich reduzierten Energietransfer und während der schwach denaturierenden Gelelektrophorese konnte ein Zerfall der Pigment-Protein-Komplexe beobachtet werden.

Die Mutanten Nr. 16 und 18, sowie 7 weitere zufällig ausgewählte Mutanten wurden sequenziert. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.9 dargestellt.

Mutante	Codon-Position	Nukleotidaustausche	Aminosäure-Austausche
1		-	-
7		-	-
8	D211	GAT>GAC	-
9	L166	TTA>CTA	-
10		-	-
13		-	-
16	N183	AAC>GAC	N183D
18	N183	AAC>GAC	N183D
20		-	-

Tab. 3.9: Austausch in sequenzierten Mutanten.

Die Plasmid-DNA der genannten Mutanten wurde extrahiert, gereinigt und mit Primer S2 sequenziert. Die Auftrennung der Produkte der Sequenzierreaktion wurde von einem kommerziellen Anbieter (Genterprise, Mainz) durchgeführt.

In beiden Proteinen, die reduzierten Energietransfer und einen geringen Komplexbandenanteil auf dem schwach denaturierenden Gel zeigen, wurde die gleiche Aminosäure ausgetauscht. Asparagin 183, die Bindestelle für Chl *a*₂, wurde durch ein Aspartat ersetzt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das zweifache Auftreten dieser Mutation auf eine Duplikation der entsprechenden Transformanden zurückzuführen ist. Dennoch wurde die Stabilität dieser Mutante in weiteren Experimenten untersucht (Kap. 3.2.3).

3.2.3 Stabilität der Mutanten E207G und N183D

Das gehäufte Auftreten der beiden Mutanten E207G und N183D könnte ein Hinweis auf einen stabilisierenden Effekt dieser Mutationen sein. In bisherigen Experimenten, Energietransfer nach SDS-Verdünnungsrekonstitution und Anteil der grünen Pigment-Protein-Komplexbande nach einer schwach denaturierenden Gelelektrophorese, ergaben sich keine Hinweise auf eine erhöhte Stabilität dieser Mutanten. Die Mutation N183D schien die Stabilität des Pigment-Protein-Komplexes sogar eher herabzusetzen.

In weiteren Experimenten zur Stabilität der Pigment-Protein-Komplexe zeigte sich, dass der Einfluss einer Mutation nicht unter allen experimentellen Bedingungen gleich ist (vgl. Kap. 3.4). Im Folgenden wurde die Stabilität der Mutanten E207G und N183D unter verschiedenen Bedingungen untersucht.

3.2.3.1 Anteil der grünen Pigment-Protein-Komplexbande nach einer schwach denaturierenden Gelelektrophorese

Während einer schwach denaturierenden Gelelektrophorese trennt sich der Pigment-Protein-Komplex von unpigmentiertem Apoprotein. Während die grüne Pigment-Protein-Bande schon vor einer Proteinfärbung sichtbar ist, zeigt sich die Apoproteinbande erst nach einer Färbung mit Coomassie-Brillant Blau. Das Verhältnis der Apoprotein- und der Komplexbande spiegelt die Ausbeute an Pigment-Protein-Komplex nach einer schwach denaturierenden Gelelektrophorese wider. Da die schwach denaturierende Gelelektrophorese ohne weitere Aufreinigung der Pigment-Proteinkomplexe direkt im Anschluss an die Rekonstitution erfolgte, ist diese Ausbeute nicht nur von der Stabilität der Pigment-Protein-Komplexe abhängig, sie wird auch von der Rekonstitutionsausbeute beeinflusst.

Vergleichende Stabilitätsuntersuchungen an destabilisierten Mutanten (Kap. 3.4) zeigten die Eignung eines Gelstringenz-Systems, bei dem durch Kombination zweier Rekonstitutionsmethoden (Frier-Tau-Zyklen und Detergenswechsel) und zweier

verschiedener Elektrophoresepuffer (Deriphat- und LDS-Laufpuffer) unterschiedliche Stringenzstufen der schwach denaturierenden Gelelektrophorese erreicht werden konnten.

3.2.3.1.1 Auswahl geeigneter Bedingungen für die schwach denaturierende Gelelektrophorese

Es wurde beobachtet, dass die Ausbeute an Pigment-Protein-Komplexen nach einer schwach denaturierenden Gelelektrophorese nicht nur von der Wahl der Rekonstitutionsmethode und des Elektrophoresepuffers abhängig ist. In den folgenden Experimenten wurden die Komplexbandenintensitäten nach Rekonstitution mit unterschiedlichen DTT- und Gesamt-xanthophyll-Gehalten (Abb. 3.28) und nach Auftrag verschiedener Proteinmengen (Abb. 3.29) verglichen und die Bedingungen für die weiteren schwach denaturierenden Gelelektrophoresen festgelegt.

Der Einfluss unterschiedlicher DTT- und Gesamt-xanthophyll-Gehalte während der Rekonstitution wurde anhand der destabilisierten Mutante N115Y (vgl. Kap. 3.4) überprüft. Nach einer Detergenswechselrekonstitution wurden die Komplexe in einer schwach denaturierenden LDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 3.28).

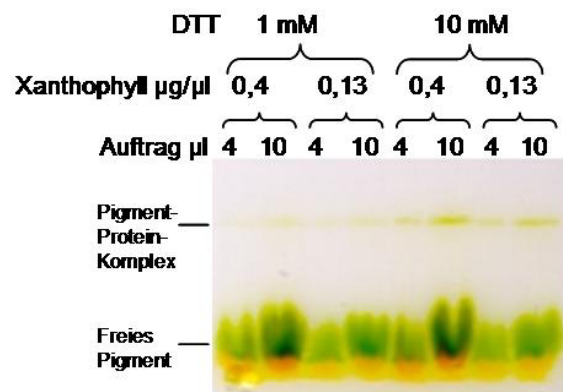


Abb. 3.28: Einfluss des DTT- und Xanthophyll-Gehaltes während der Rekonstitution auf die Komplexbandenintensität nach einer schwach denaturierenden Gelelektrophorese.

N115Y wurde durch Detergenswechsel mit den angegebenen DTT- und Xanthophyllgehalten rekonstituiert. Jeweils 4 und 10 µl des Rekonstitutionsansatzes wurden auf ein 12 % PAA-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde unter schonenden Bedingungen mit LDS-Laufpuffer durchgeführt.

Nach Rekonstitution mit 10 mM DTT waren für die destabilisierte Mutante N115Y deutliche grüne Pigment-Protein-Komplexbanden zu erkennen, während nach Rekonstitution mit 1 mM DTT kaum noch Komplexbanden zu sehen waren. Ein erhöhter Xanthophyll-Gehalt führte zu einer weiteren Verbesserung der Ausbeute.

Die Komplexbandenintensitäten auf 12- bzw. 15 % PAA-Gelen wurden ebenfalls verglichen (nicht gezeigt), es konnten jedoch keine größeren Unterschiede festgestellt werden. Auf 10 und 12 % PAA-Gelen befindet sich die Pigment-Protein-Komplexbande unterhalb der Apoproteinbande (Abb. 3.22), auf 15 % PAA-Gelen bleibt die Pigment-Protein-Komplexbande dagegen hinter der Apoproteinbande zurück (Abb. 3.29). Im Folgenden wurden nur 15 % PAA-Gele zur Auftrennung von Pigment-Protein-Komplexen verwendet.

Bei der Verwendung von Deriphat-Puffer zeigte sich ein deutlicher Einfluss des Auftragsvolumens auf das Verhältnis von Apoprotein- und Komplexbande (Abb. 3.29). Verschiedene Volumina eines Rekonstitutionsansatzes mit Lhcb1-Protein wurden in einer schwach denaturierenden Gelelektrophorese unter Verwendung von Deriphatpuffer aufgetrennt.

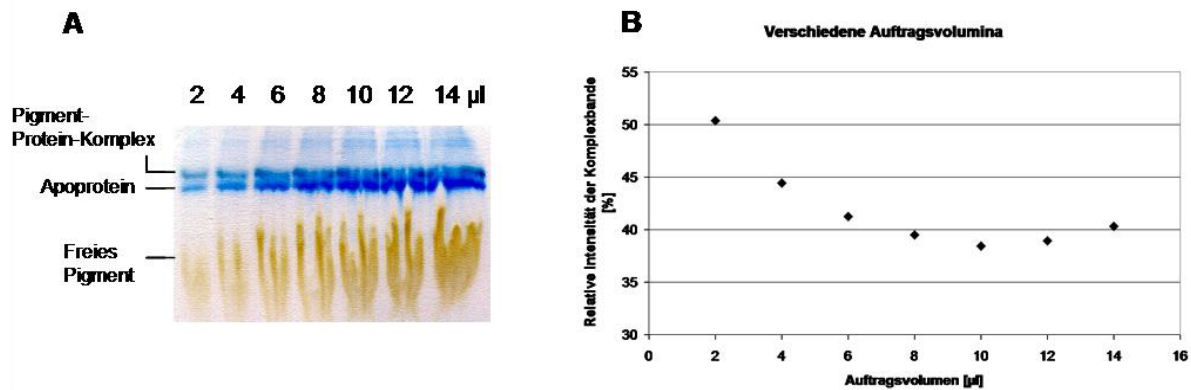


Abb. 3.29: Einfluss des Auftragsvolumens auf die relative Komplexbandenintensität.

Lhcb1 (D7f.3) wurde durch Detergenswechsel rekonstituiert (1 mM DTT; 0,13 µg/µl Xanthophyll). Verschiedene Volumina wurden auf ein schwach denaturierendes Gel aufgetragen (15 % PAA; Deriphat-Laufpuffer). Nach einer Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau (A) wurden die Intensitäten der Proteinbanden bestimmt. Abb. B zeigt den Anteil der Komplexbande in %, bezogen auf die Summe der Intensitäten aus Komplex- und Apoproteinbande.

Höhere Auftragsvolumina führten zu einem geringeren Anteil der Komplexbande, bezogen auf die Gesamtintensität der beiden Proteinbanden nach einer Coomassie-Färbung (Abb. 3.29 B). Außerdem konnten bei Auftragsvolumina ab 6 µl oft keine gleichmäßigen Banden erreicht werden, was die Auswertung erschwerte. Im Folgenden wurden immer 4 µl des Rekonstitutionsansatzes mit 1,6 µg Protein in schwach denaturierende Gelelektrophoresen eingesetzt.

In Abb. 3.29 wurden bei Auftrag von 4 µl Rekonstitutionsansatz lediglich 45 % Komplexbandenintensität erreicht. In Kap. 3.4 konnten für unmutiertes Lhcb1-Protein nach Detergenswechselrekonstitution und Verwendung von Deriphat-Puffer in der schwach denaturierenden Gelelektrophorese relative Komplexbandenintensitäten von 60 % erreicht werden. Dieser Unterschied ist vermutlich auf den unterschiedlichen DTT- und Xanthophyll-Gehalt während der Rekonstitution zurückzuführen, deren Einfluss auf die Ausbeuten der destabilisierten Mutanten N115Y in Abb. 3.28 zu sehen ist. Für alle folgenden schwach denaturierenden Gelelektrophoresen wurde in Anwesenheit von 10 mM DTT und 0,4 µg/µl Gesamtxanthophyll rekonstituiert.

3.2.3.1.2 Relative Komplexbandenintensitäten von E207G und N183D

E207G und N183D wurden durch Frier-Tau-Zyklen oder durch Detergenswechsel rekonstituiert und in schwach denaturierenden Gelelektrophoresen aufgetrennt. Dabei wurde entweder ein Laufpuffer verwendet, der das schonende Detergens Deriphat enthielt, oder die Elektrophorese wurde mit LDS-Laufpuffer durchgeführt (Abb. 3.30 A).

Nach einer Coomassie-Färbung wurden die Intensitäten der Proteinbanden bestimmt. Wie in Abb. 3.29 wurden die relativen Intensitäten der grünen Pigment-Protein-Komplexbanden, bezogen auf die Summe der Intensitäten von Apoprotein- und Komplexbande, berechnet (Abb. 3.29 B). Dabei wurde die Intensität der Komplexbande durch die Grünfärbung der Pigmente überschätzt. Die Werte spiegeln demnach nicht den prozentualen Anteil an komplexiertem Protein wider, eignen sich aber für vergleichende Betrachtungen.

Die Mutanten E207G und N183D enthielten zusätzlich zu der Namensgebenden Mutation den Austausch I143H, der in den Ausgangsklon der Zufallsmutagenese eingefügt werden musste, um eine *SphI*-Schnittstelle zu generieren (Kap. 3.2.1.1). Um einen Effekt des Austausches E207G oder N183D nachzuweisen, wurde I143H als Kontrolle verwendet, die sich jedoch nur unwesentlich anders verhielt als Wildtyp-Lhcb1 (vgl. Abb. 3.48).

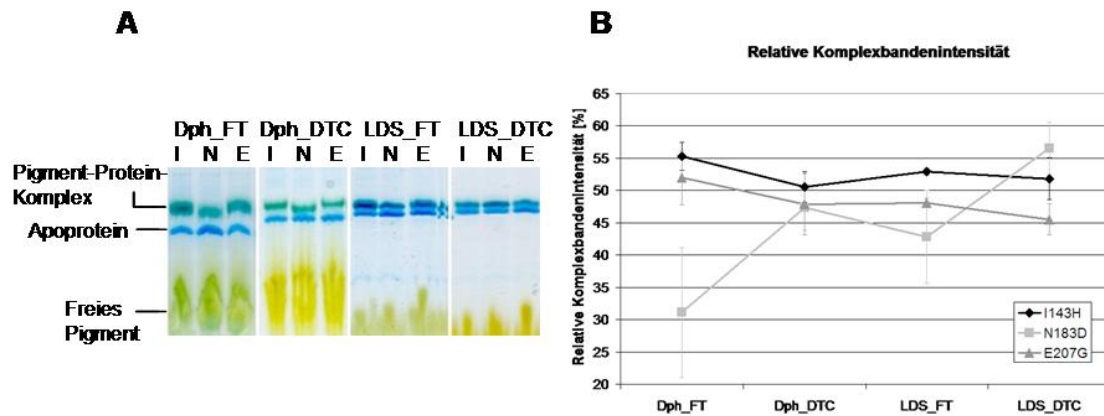


Abb. 3.30: Rekonstitution und schwach denaturierende Gelelektrophorese unter verschiedenen Bedingungen.

I143H (I), N183D (N) und E207G (E) wurden durch Detergenswechsel (DTC) bzw. Frier-Tau-Zyklen (FT) in der Gegenwart von 10 mM DTT und 0,4 µg/µl Gesamt-xanthophyll rekonstituiert. Jeweils 4 µl der Rekonstitutionsansätze wurden auf 15 % PAA-Gelen unter schwach denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Dabei wurde entweder Deriphat- (Dph) oder LDS-Laufpuffer verwendet. Nach der Coomassie-Färbung (A) wurden die Intensitäten der Proteinbanden gemessen. In B sind die relativen Intensitäten der Komplexbanden, bezogen auf die Summe der Intensitäten von Apoprotein- und Komplexbande, dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei Messungen. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. Die schwach denaturierenden Gelelektrophoresen wurden von Sonja G. im Rahmen einer Diplomarbeit unter Anleitung der Autorin durchgeführt.

Ein stabilisierender Effekt der Mutation E207G konnte in diesem Versuch nicht nachgewiesen werden. Die Ausbeuten an Pigment-Protein-Komplexen lagen etwas niedriger als für die Kontrolle I143H. Bei gleicher Rekonstitutionsmethode wurden bei Verwendung des Deriphat-Laufpuffers höhere Ausbeuten erzielt als mit LDS-Laufpuffer, Rekonstitution durch Frier-Tau-Zyklen ergab höhere Ausbeuten als die Detergenswechsel-Rekonstitution (Abb. 3.30).

Die Mutante N183D zeigte ein völlig anderes Bild: Bei gleicher Rekonstitutionsmethode lagen die Ausbeuten auf LDS-Gelen deutlich höher und die Frier-Tau-Rekonstitution lieferte deutlich schlechtere Ausbeuten als die Rekonstitution durch Detergenswechsel.

Der Vergleich mit I143H ergab entsprechend je nach Bedingung ein anderes Bild: Nach Frier-Tau-Rekonstitution und Deriphat-Gelelektrophorese zeigte N183D deutlich schlechtere Ausbeuten, während nach Detergenswechsel und LDS-Gelelektrophorese höhere relative Komplexbandenintensitäten erreicht wurden und die Mutante N183D demnach als stabiler beschrieben werden könnte.

Ein ähnliches Verhalten, wenn auch insgesamt wesentlich geringere Ausbeuten, konnte für G184S beobachtet werden (Abb. 3.31), eine Lhcb1-Mutante, die nach fluoreszenzkinetischen Messungen als stabiler beschrieben wurde (Heinemann, 2000).

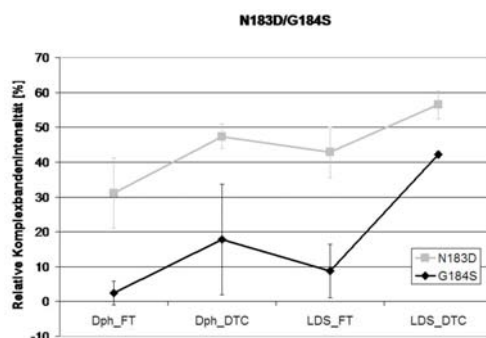


Abb. 3.31: Relative Komplexbandenintensitäten der Mutanten N183D und G184S im Vergleich.

Entsprechend Abb. 3.30 sind hier die relativen Komplexbandenintensitäten von N183D und G184S gezeigt.

3.2.3.2 Fluoreszenzkinetik

In intakten LHCIIB-Komplexen transferiert Chl *b* seine Anregungsenergie auf Chl *a*. Nach gezielter Anregung von Chl *b* mit Licht der Wellenlänge 470 nm kann in einem Fluoreszenzspektrum Chl *a*-Fluoreszenz mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von 680 nm nachgewiesen werden. Zerfall der Komplexe führt zu einem Verlust der Energietransferierenden Eigenschaften, entsprechend ist ein Anstieg der Chl *b*- und ein Rückgang der Chl *a*-Fluoreszenz zu beobachten.

Die Geschwindigkeit der zeitlichen Änderung der Chl *b*- und Chl *a*-Fluoreszenzen kann ebenfalls zum Vergleich der Stabilitäten unterschiedlicher Pigment-Protein-Komplexe herangezogen werden.

3.2.3.2.1 Zeitabhängige Änderung des Energietransfers bei 37°C

Nach einer Methode von Yang et al., 1999, wurden die Lhcb1-Proteine durch Detergenswechsel rekonstituiert und anschließend mit 1 % OG; 10 % Glycerin; 0,1 M Tris-HCl (pH 7) verdünnt. Im Unterschied zu Yang et al., 1999 wurde eine Detergenswechsel-Rekonstitution unter Standardbedingungen (0,4 µg/µl Protein; 1 µg/µl Chlorophyll; 0,13 µg/µl Gesamtxanthophyll; 1 mM DTT) durchgeführt und die Rekonstitutionsansätze wurden um Faktor 60 mit dem angegebenen Puffer verdünnt.

Vor der kinetischen Messung wurde ein Kontrollspektrum bei Raumtemperatur aufgenommen (Abb. 3.32 A). Anschließend wurde die Änderung der Chl *b*- (660 nm) und Chl *a*- (680 nm) Fluoreszenzen über 200 sec bei 37°C verfolgt (Abb. 3.33). Nach der kinetischen Messung wurde ein weiteres Spektrum bei 37°C aufgenommen (Abb. 3.32 B).

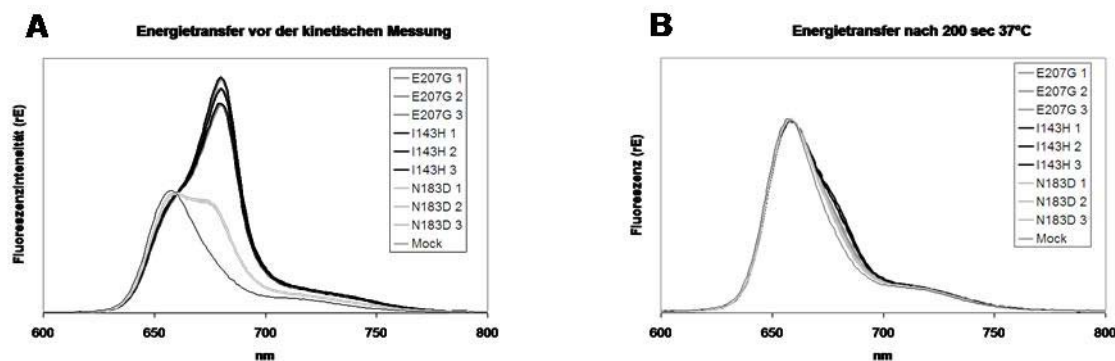


Abb. 3.32: Energietransfer vor (A) und nach (B) der kinetischen Messung.

E207G, I143H, N183D und eine Kontrolle ohne Protein (Mock) wurden durch Detergenswechsel rekonstituiert (1 mM DTT; 0,13 µg/µl Gesamtxanthophyll), 20 min bei 4°C (14000 rpm) zentrifugiert und um Faktor 60 mit eiskaltem Puffer (1 % OG; 10 % Glycerin; 0,1 M Tris-HCl, pH 7) verdünnt. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde ein Fluoreszenzspektrum von 600-800 nm bei Raumtemperatur aufgenommen (A). Anregungswellenlänge: 470 nm. Abbildung (B) zeigt ein weiteres Fluoreszenzspektrum, das nach der kinetischen Messung (Abb. 3.33) bei 37°C aufgenommen wurde. Die Spektren wurden auf gleiche Fluoreszenz bei 660 nm normiert. Bei den 3 dargestellten Messungen für jede Lhcb1-Mutante handelte es sich um unabhängige Rekonstitutionsansätze.

Im Vergleich zu den Energietransfermessungen in Kap. 3.2.2, die nach einer SDS-Verdünnungsrekonstitution mit unverdünnten Rekonstitutionsansätzen durchgeführt wurden, zeigen sich hier (Abb. 3.32) größere Unterschiede zwischen der Kontrolle ohne Protein (Mock) und rekonstituierten Lhcb1-Proteinen. In der Kontrolle ohne Protein war kein Energietransfer nachweisbar, während Ansätze mit allen drei Mutanten bei gleicher Chl *b*-Fluoreszenz deutlich mehr Chl *a*-Fluoreszenz zeigten. Der Energietransfer der Mutante N183D blieb allerdings deutlich hinter dem der beiden anderen Lhcb1-Proteine zurück (Abb. 3.32 A). Wie erwartet, ist nach 200 sec bei 37°C kaum noch Chl *a*-Fluoreszenz nachweisbar

(Abb. 3.32 B). Alle Ansätze mit Lhcb1-Mutanten zeigten im Vergleich zur Kontrolle ohne Protein jedoch noch eine schwache Schulter bei 680 nm. Diese Schulter ist in I143H am stärksten ausgeprägt.

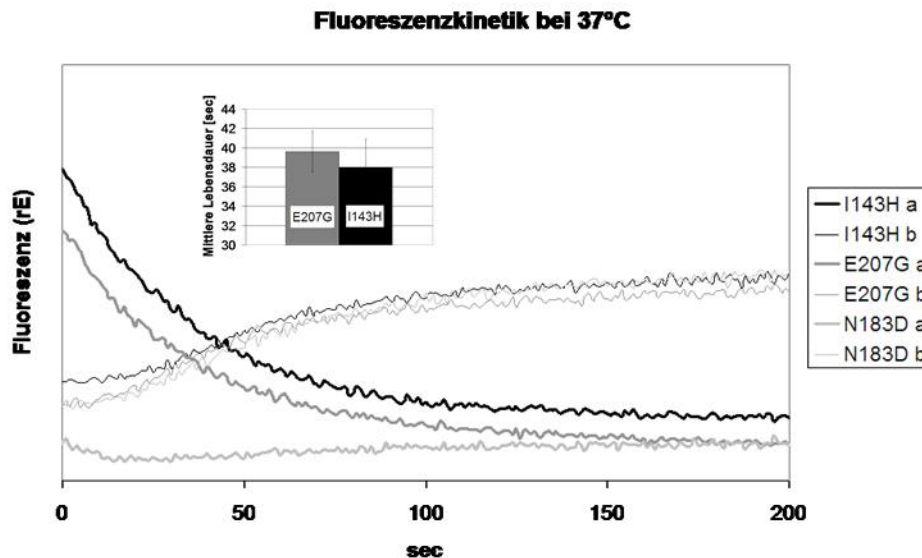


Abb. 3.33: Zeitliche Änderung der Chl *b*- und Chl *a*-Fluoreszenz nach Chl *b*-Anregung bei 37°C. Nach Detergenswechselrekonstitution, Zentrifugation, Verdünnung und 5 min Inkubation auf Eis wie in Abb. 3.32 beschrieben, wurde die Probe in die auf 37°C temperierte Küvette eingefüllt und die Änderung der Chl *b*- (660 nm) und Chl *a*- (680 nm) Fluoreszenz nach Anregung von Chl *b* (470 nm) wurde verfolgt. An die Zerfallskurven der Chl *a*-Fluoreszenz wurden in Table Curve 2D Zerfallsfunktionen erster Ordnung ($y = a + b \exp(-cx)$) angepasst. $1/c$ wurde als mittlere Lebensdauer angegeben (Inset). Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Messungen. Die Fehlerbalken entsprechen den berechneten Standardabweichungen. Für N183D wurde keine mittlere Lebensdauer berechnet.

Der zeitliche Rückgang der Chl *a*-Fluoreszenz folgte einer Zerfallsfunktion erster Ordnung und wurde zur Berechnung der mittleren Lebensdauer herangezogen. Der Anstieg der Chl *b*-Fluoreszenz hatte dagegen eher sigmoidalen Charakter, was evtl. auf einen Effekt des freien Pigmentes zurückzuführen war. Ein solcher Effekt war allerdings durch eine Kontrolle ohne Protein nicht nachzuvollziehen, da keine kinetischen Änderungen der Chl *a*- und Chl *b*-Fluoreszenzen zu beobachten waren (nicht gezeigt). Vermutlich beeinflusst die Anwesenheit des Lhcb1-Proteins das Aggregationsverhalten der Chlorophylle und führt zu unterschiedlichem Verhalten der freien Pigmente in Proben mit und ohne Lhcb1-Proteine.

Das kinetische Verhalten der Lhcb1-Mutante N183D wich deutlich von den beiden anderen Proteinen ab: Die Chl *a*-Fluoreszenz zeigte kaum eine zeitabhängige Änderung sondern blieb auf demselben niedrigen Niveau wie zu Beginn der Messung. Im Gegensatz dazu verlief der zeitabhängige Anstieg der Chl *b*-Fluoreszenz ähnlich wie bei I143H und E207G. Falls der Anstieg der Chl *b*-Fluoreszenz auf einen Rückgang des Energietransfers zurückzuführen ist, wovon ausgegangen wird, kann Chl *b* in Pigment-Protein-Komplexen mit der Lhcb1-Mutante N183D seine Energie nicht auf Chl *a* übertragen. Die unnormierten Fluoreszenzspektren von N183D vor und nach der kinetischen Messung im Vergleich zu I143H verdeutlichen diesen Effekt (Abb. 3.34).

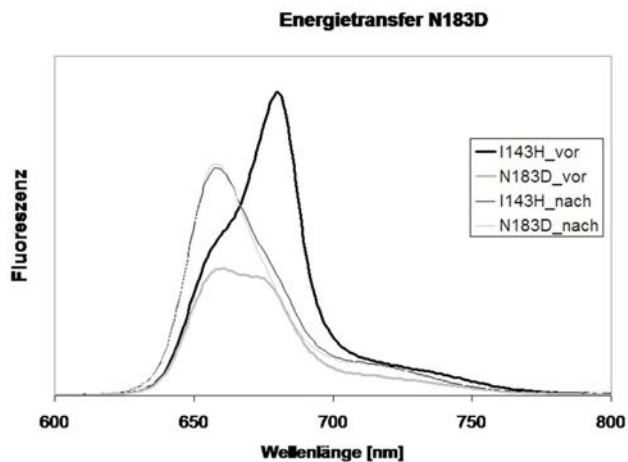


Abb. 3.34: Energietransfer von N183D und I143H vor und nach der kinetischen Messung.

Die Fluoreszenzspektren vor und nach der kinetischen Messung wurden wie in Abb. 3.32 beschrieben aufgenommen und sind hier ohne Normierung gezeigt.

Da für N183D keine kinetische Änderung der Chl *a*-Fluoreszenz zu beobachten war (Abb. 3.33) konnte auch keine mittlere Lebensdauer der Komplexe bestimmt werden. Die mittleren Lebensdauern der Lhcb1-Mutanten I143H und E207G lagen in einem ähnlichen Bereich, E207G zeigte im Mittel eine Lebensdauer, die etwa um 2 sec über der von I143H lag (Abb. 3.33 B).

Falls der Austausch E207G stabilisierend wirken sollte, könnte der stabilisierende Effekt auf den Verlust der negativen Ladung des Glutamates zurückzuführen sein. Entsprechend würde sich im Vergleich zwischen I143H und E207G der stabilisierende Effekt des Ladungsverlustes nur zeigen, wenn E207 in I143H nicht protoniert vorliegt. Die bisherigen Messungen wurden bei pH 7 durchgeführt, und Glutamat, mit einem isoelektrischen Punkt bei pH 3,1, sollte eigentlich nicht protoniert vorliegen. Allerdings wird der pK-Wert einer Aminosäure auch von der Proteinumgebung beeinflusst, weshalb eine Protonierung von E207 bei pH 7 nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Eine Stabilisierung des Pigment-Protein-Komplexes bei pH 9 könnte zu einem Selektionsvorteil dieser Mutante während der Selektionsprozedur (Trypsinverdau bei pH 9) geführt haben, wäre aber evtl. bei pH 7 nicht zu erkennen. Daher wurde die Bestimmung der mittleren Lebensdauer bei verschiedenen pH-Werten wiederholt.

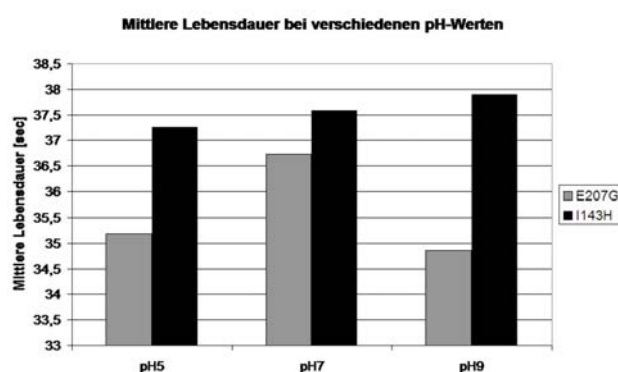


Abb. 3.35: Mittlere Lebensdauer von E207G und I143H bei verschiedenen pH-Werten.

Nach Detergenswechselrekonstitution (1 mM DTT; 0,13 µg/µl Gesamt-xanthophyll) und Zentrifugation (20 min, 4°C, 12000 rpm) wurden die Rekonstitutionsansätze um Faktor 60 in Puffern mit 1 % OG; 10 % Glycerin und verschiedenen pH-Werten verdünnt: pH 5,2 (0,1 M Na-Acetat); pH 7 (0,1 M Tris-HCl); pH 9 (0,1 M Tris-HCl). Die mittlere Lebensdauer bei 37°C wurde bestimmt wie in Abb. 3.33 beschrieben. Pro pH-Wert und Lhcb1-Mutante wurde eine Messung durchgeführt. (Ausführung durch Martin S. unter Anleitung der Autorin.)

Die erwartete längere Lebensdauer von E207G bei pH 9 im Vergleich zu pH 7 war nicht zu beobachten. Stattdessen zeigte E207G sowohl bei pH 9 als auch bei pH 5 eine deutlich kürzere Lebensdauer als I143H. Der deutlichste Unterschied war bei pH 9 zu beobachten, wo E207G fast um 3 sec schneller zerfiel. Es bleibt allerdings zu beachten, dass sich die beobachteten Unterschiede der mittleren Lebensdauer immer noch in einem Rahmen

bewegten, in dem auch die Werte der drei Parallelmessungen in Abb. 3.33 schwankten und daher nicht überbewertet werden dürfen.

Ein weiterer Unterschied zwischen den Selektionsbedingungen und der Bestimmung der Halbwertszeit lag in den unterschiedlichen DTT-Konzentrationen der Rekonstitutionsansätze. Während der Selektion von E207G (Kap. 3.2.2.1) wurde die Rekonstitution ohne DTT durchgeführt, für die bisherigen Bestimmungen der mittleren Lebensdauer war dagegen 1 mM DTT im Rekonstitutionsansatz enthalten. Abb. 3.36 zeigt die Energietransferraten nach Rekonstitution mit unterschiedlichen DTT-Gehalten.

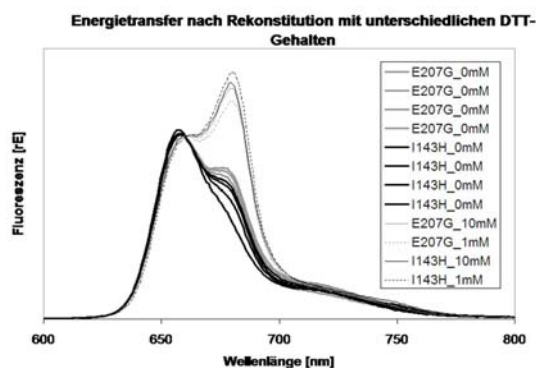


Abb. 3.36: Energietransfer nach Rekonstitution mit unterschiedlichen DTT-Gehalten.

E207G und I143H wurden durch Detergenswechsel rekonstituiert (0,13 µg/µl Gesamt-xanthophyll), wobei die DTT-Konzentration 0, 1 oder 10 mM betrug, wie in der Legende angegeben. Die Messung des Energietransfers erfolgte wie in Abb. 3.33 A, es wurde mit Verdünnungspuffer pH 9 (0,1 M Tris-HCl, pH 9; 1 % OG; 10 % Glycerin) verdünnt. Für die Rekonstitution ohne DTT sind jeweils 4 Messungen gezeigt. Der Rekonstitutionsansatz mit 10 mM DTT wurde in Verdünnungspuffer mit ebenfalls 10 mM DTT verdünnt. Die Spektren wurden auf gleiche Emission bei 660 nm normiert. (Durchgeführt von Martin S. unter Anleitung der Autorin.)

Nach Rekonstitution ohne DTT war lediglich ein geringer Energietransfer festzustellen, der in unterschiedlichen Messungen relativ stark schwankte. E207G zeigte tendenziell etwas mehr Energietransfer als I143H. Im Gegensatz zu dem Verhalten auf schwach denaturierenden Gelen, wo entscheidende Unterschiede nach Rekonstitution mit 1 oder 10 mM DTT auftraten (Abb. 3.28), wurden zwischen diesen beiden Ansätzen keine größeren Unterschiede in der Energietransferrate beobachtet (Abb. 3.36). Eine Bestimmung der mittleren Lebensdauer war für die Ansätze ohne DTT aufgrund der geringen Signaländerung nicht möglich.

3.2.3.2.2 Zeitabhängige Änderung des Energietransfers in Gegenwart von 4 M Guanidiniumhydrochlorid

In einem weiteren Versuch, die Stabilitäten der Lhcb1-Mutanten E207G und I143H zu beurteilen, wurden die mittleren Lebensdauern der Pigment-Protein-Komplexe in Gegenwart von 4 M Guanidiniumhydrochlorid als denaturierendes Agens verglichen. Nach einer SDS-freien Guanidiniumhydrochlorid-Rekonstitution (Yang et al., 2003) wurden die Pigment-Protein-Komplexe in einer Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt (Abb. 3.37).

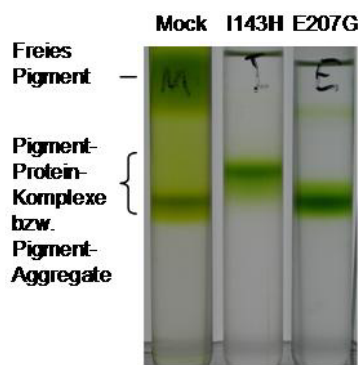


Abb. 3.37: Auftrennung der Pigment-Protein-Komplexe nach Guanidiniumhydrochlorid-Rekonstitution in einem Saccharose-Dichtegradienten.

I143H, E207G und eine Kontrolle ohne Protein wurden nach Denaturierung in 6 M Guanidiniumhydrochlorid durch Verdünnung in 2,5 % OG rekonstituiert. Nach der Rekonstitution wurden die Ansätze 1 : 1 mit eiskaltem Rekonstitutionspuffer ohne Saccharose (50 mM Na-Borat, pH 9; 10 mM β -Mercaptoethanol) verdünnt. Nach der Verdünnung wurden die Ansätze mit I143H und E207G, nicht jedoch die Kontrolle ohne Protein, nochmals für 2 min bei 4°C (14000 rpm) zentrifugiert. Der Überstand, ca. 1,5 ml mit 300 μ g Protein, wurde auf Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen. (Durchgeführt von Martin S. unter Anleitung der Autorin.)

Vor dem Auftrag der Proben auf die Dichtegradienten musste mit einem Puffer ohne Saccharose verdünnt werden. Wurde nach dieser Verdünnung auf eine kurze Zentrifugation bei 4°C (14 000 rpm) verzichtet, wurde die Komplexbande von einer Bande mit Pigmentaggregaten (Abb. 3.37 Mock) überdeckt. Diese Pigment-Aggregatbande des Ansatzes ohne Protein wurde in den folgenden Experimenten als Kontrolle verwendet.

Die Dichtegradientenbanden wurden abgezogen und mit Puffer (5 mM Tricine, pH 7,8; 0,1 % LM; 10 % Saccharose) auf eine Absorption von 0,1 bei 470 nm verdünnt. Anschließend erfolgte eine weitere Verdünnung im Verhältnis 1 : 1 mit dem gleichen Puffer (Kontrolle in 0,1 % LM), bzw. mit einem Puffer der zusätzlich 8 M Guanidiniumhydrochlorid enthielt. Über einen Zeitraum von 135 min wurde alle 5 bis 20 min ein Fluoreszenzspektrum nach Anregung bei 470 nm gemessen (Abb. 3.38).

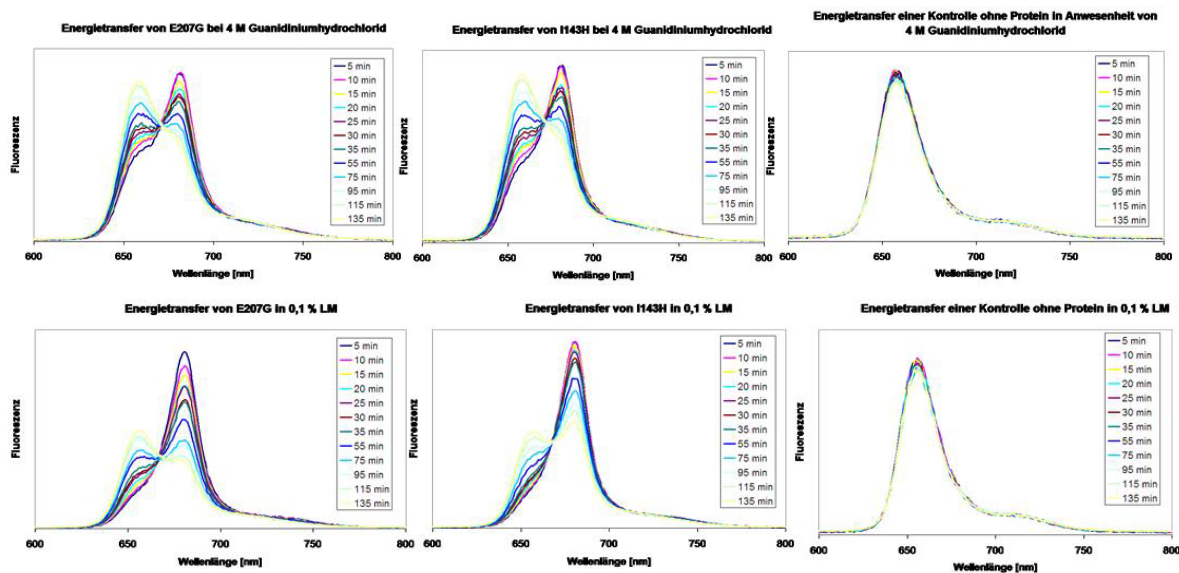


Abb. 3.38: Fluoreszenzspektren in 4 M Guanidiniumhydrochlorid bzw. 0,1 % LM nach Anregung bei 470 nm.

Nach Guanidiniumhydrochloridrekonstitution und Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (Abb. 3.37) wurden die Pigment-Protein-Komplex bzw. Pigment-Aggregatbanden abgezogen und mit 5 mM Tricine (pH 7,8); 0,1 % LM und 10 % Saccharose auf eine Absorption von 0,1 bei 470 nm verdünnt. Nach einer weiteren Verdünnung im Verhältnis 1 : 1 mit demselben Puffer bzw. mit einem Puffer, der zusätzlich noch 8 M Guanidiniumhydrochlorid enthielt, wurden Fluoreszenzspektren nach einer Anregung bei 470 nm in den angegebenen Zeitabständen aufgenommen. Während des Messzeitraumes wurden die Proben bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. (Durchgeführt von Martin S. unter Anleitung der Autorin.)

Das erste Fluoreszenzspektrum nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur zeigte für beide Ansätze mit Protein hauptsächlich Chlorophyll *a*-Fluoreszenz, während in der Kontrolle ausschließlich Chlorophyll *b*-Fluoreszenz zu beobachten war. Über den Messzeitraum von 135 min sank die Chlorophyll *a*-Fluoreszenz in den Proben mit 4 M Guanidiniumhydrochlorid, während die Chlorophyll *b*-Fluoreszenz in gleichem Maße anstieg, was einen Rückgang des Energietransfers anzeigte.

Die Vergleichsproben in 0,1 % LM ohne Guanidiniumhydrochlorid zeigten ebenfalls einen zeitabhängigen Rückgang des Energietransfers, die Chl *b*-Fluoreszenz erreichte jedoch nicht die Intensität der Chl *a*-Fluoreszenz zu Beginn der Messung, wie für die Proben mit 4 M Guanidiniumhydrochlorid beobachtet werden konnte.

Die Fluoreszenzen bei 682 nm (Chl *a*) und 660 nm (Chl *b*) wurden in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen und durch Zerfalls- ($y = a + b \exp(-cx)$) bzw. Formierungskurven ($y = a + b(1 - \exp(-cx))$) angepasst (Abb. 3.39).

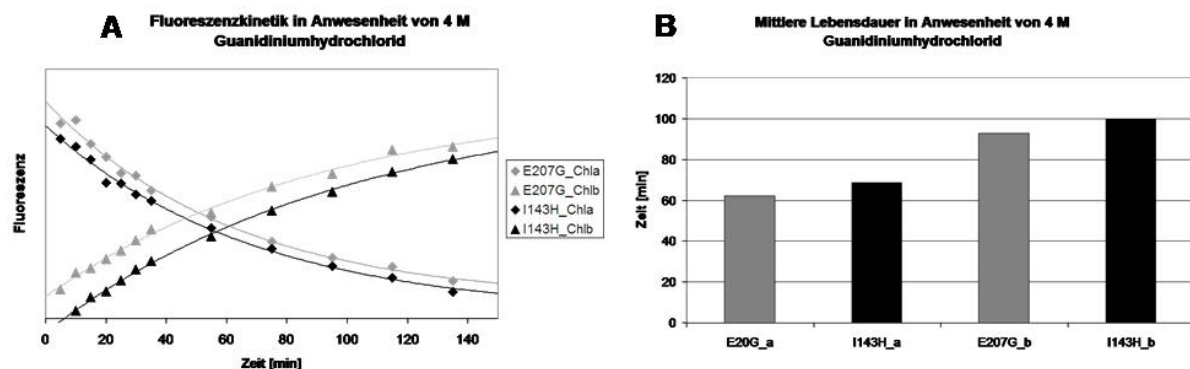


Abb. 3.39: Mittlere Lebensdauer von E207G und I143H in Gegenwart von 4 M Guanidiniumhydrochlorid.

Die Fluoreszenzen bei 682 nm (Chl *a*) und 660 nm (Chl *b*) aus den Spektren in Abb. 3.38 wurden in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen und durch Zerfalls- ($y = a + b \exp(-cx)$) bzw. Formierungskurven ($y = a + b(1 - \exp(-cx))$) angepasst (Linien in Abb. 3.39 A). $1/c$ wurde als mittlere Lebensdauer in Teil B der Abbildung dargestellt.

Beide Kurven, sowohl Chl *a*-Rückgang als auch Chl *b*-Anstieg ließen sich durch kinetische Funktionen erster Ordnung anpassen. Die errechnete mittlere Lebensdauer der Chl *a*-Fluoreszenz war dabei um 30 min kürzer als die der Chl *b*-Fluoreszenz. Zwischen den mittleren Lebensdauern von E207G und I143H traten nur kleinere Unterschiede von ca. 7 min auf.

3.2.3.3 Trypsinverdau

Weder die schwach denaturierende Gelelektrophorese noch die kinetische Änderung des Energietransfers erbrachte Hinweise auf eine Stabilisierung der Mutanten E207G und N183D die zu ihrer Anreicherung während der Selektionsexperimente geführt haben könnten.

Nachdem für N183D gezeigt wurde, dass die Komplexstabilität von den Bedingungen der Messung abhängig sein kann (Abb. 3.30), wurde die Stabilität der Komplexe unter Selektionsbedingungen verglichen. Dazu wurden die Proteine durch Detergenswechsel rekonstituiert und anschließend mit Trypsin verdaut. Der Verdau wurde bei Raumtemperatur, bei Raumtemperatur mit erhöhter SDS-Konzentration und bei 37°C durchgeführt. Außerdem wurden die Rekonstitutionen entweder mit 1 mM DTT oder ohne DTT durchgeführt.

Während der Selektionsexperimente wurde der Chymotrypsin-Inhibitor TPCK zugegeben, der allerdings bei Verdau des nicht-phagengebundenen Proteins zu Artefakten führte (Abb. 3.40).

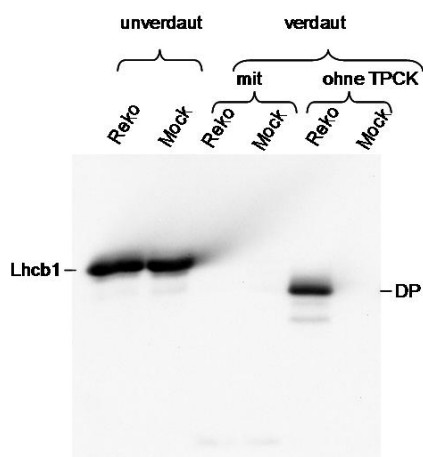


Abb. 3.40: Effekt des Chymotrypsin-Inhibitors TPCK auf den tryptischen Verdau von LHCIIb. D7f.3 wurde durch Detergenswechsel in Gegenwart von 1 mM DTT und 0,13 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Gesamtxanthophyll rekonstituiert (Reko). Als Kontrolle wurde die Rekonstitutionsprozedur ohne Pigmente durchgeführt (Mock). Nach der Rekonstitution wurden die Proteine in Gegenwart von 10 mM Hepes/KOH (pH 8), und gegebenenfalls 1 mg/ml TPCK, mit 0,1 mg/ml Trypsin (Boehringer Mannheim, Deutschland) für 30 min bei Raumtemperatur verdaut. Der Verdau wurde durch 0,2 mM PMSF gestoppt. Die Proben wurden mit Sparmix versetzt und in einer denaturierenden Gelelektrophorese (Lämmli, 1970) aufgetrennt. Der Auftrag pro Lane entsprach einer Ausgangsmenge von 2 μg Protein. DP: N-terminal verkürztes Lhcb1-Protein.

Lediglich in den Ansätzen ohne TPCK war nach Trypsinverdau der rekonstituierten Komplexe das erwartete Degradationsprodukt (DP in Abb. 3.40) zu sehen, wohingegen sich TPCK bei einem Trypsinverdau des Phagen-gebundenen LHCIIb nicht störend auswirkte (vgl. Abb. 3.16). Möglicherweise handelte es sich um ein Löslichkeitsproblem, das aber nicht weiter untersucht wurde.

Aufgrund der Ergebnisse in Abb. 3.40 wurde der Trypsinverdau von freiem Protein im Folgenden ohne den Chymotrypsininhibitor TPCK durchgeführt.

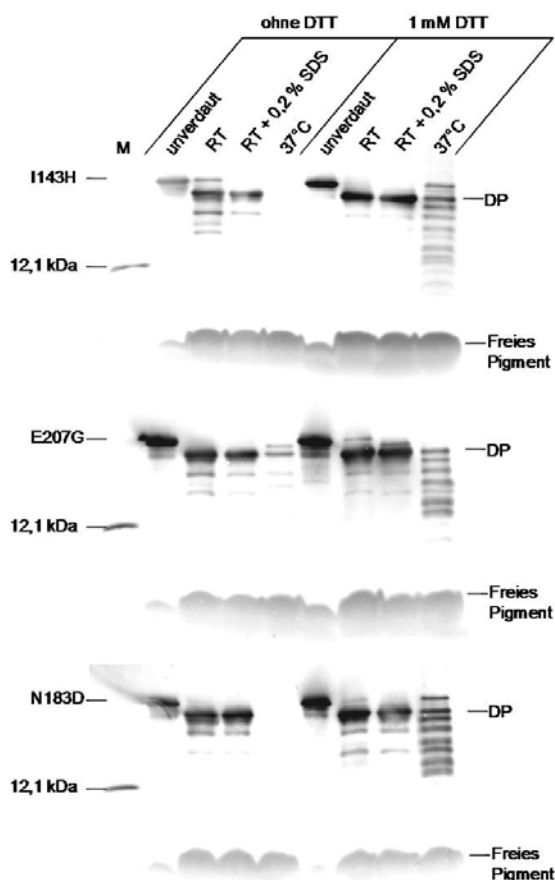


Abb. 3.41: Trypsinverdau von I143H, E207G und N183D unter verschiedenen Bedingungen.

I143H, E207G und N183D wurden je nach Angabe in der Gegenwart von 1 mM DTT oder ohne DTT durch Detergenswechsel rekonstituiert (0,13 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Gesamtxanthophyll). Anschließend wurde für 30 min unter den angegebenen Bedingungen mit 0,1 mg/ml Trypsin inkubiert. Der Verdau wurde durch Zugabe von 0,5 mM PMSF gestoppt. Die Auftrennung erfolgte in einer denaturierenden Gelelektrophorese nach Schägger et al., 1987, die Lhcb1-Proteine wurden in einem Western Blot mit Lhcb1-Antikörper nachgewiesen. Membran: PVDF. Substrat: BCIP/NBT. M: 39a.2. DP: N-terminal verkürztes tryptisches Verdauprodukt von LHCIIb. Proteinmengen: 0,22 μg unverdaute Kontrolle; verdaut: 0,875 μg (ursprünglicher Proteingehalt).

Nach Trypsinverdau bei Raumtemperatur zeigte sich für alle Lhcb1-Proteine das erwartete Degradationsprodukt (DP). Entsprechend der Ergebnisse der schwach denaturierenden Gelelektrophorese bildete demnach auch N183D Pigment-Protein-Komplexe.

Unter keiner Bedingung zeigten sich deutliche Stabilitätsunterschiede zwischen den Mutanten. Eine Inkubation bei 37°C führte offensichtlich zu weiteren tryptischen Spaltungen des Degradationsproduktes, die sich im Auftreten einer Bandenleiter äußerten. Die erhöhte SDS-Konzentration führte dagegen nicht zu einer signifikanten Reduktion der Menge des Degradationsproduktes.

Die Proben, die in Anwesenheit von 1 mM DTT rekonstituiert wurden, zeigten tendenziell mehr des N-terminal verkürzten Degradationsproduktes als die Proben, die ohne DTT rekonstituiert wurden. Am deutlichsten war dieser Effekt nach Inkubation bei 37°C zu erkennen. Nach Rekonstitution ohne DTT zeigte nur E207G nach Verdau bei 37°C noch das Degradationsprodukt, während für die anderen Lhcb1-Proteine keine Fragmente mehr nachweisbar waren. Eine Stabilisierung des Degradationsproduktes von E207G nach Rekonstitution in Anwesenheit von DTT und nach Trypsinverdau bei 37°C war dagegen nicht zu beobachten.

Falls das Ergebnis des Trypsinverdaus ohne DTT bei 37°C tatsächlich einen stabilisierenden Effekt der des E207G-Austausches anzeigte, war dieser nicht sehr stark ausgeprägt, da auch für E207G die Signalstärke im Vergleich zu einem Verdau bei Raumtemperatur deutlich abnahm. In anderen Experimenten war das Degradationsprodukt auch für I143H nach Rekonstitution ohne DTT und Trypsinverdau bei 37°C noch nachweisbar (nicht gezeigt).

3.3 Optimierungsmöglichkeiten

3.3.1 Mutationsrate

Bisher wurde angenommen, dass die von Shafikhani et al., 1997 bestimmte Fehlerrate der Mutagenese-PCR von 0,49 % pro PCR-Runde auch auf die beschriebenen Experimente (Kap. 3.2.1) zutrifft. Nach den Selektionsexperimenten konnten allerdings erstaunlich wenige Mutationen beobachtet werden. Anschließend an Selektionsexperiment 3 (Kap. 3.2.2.3) wurden beispielsweise 9 Mutanten sequenziert und insgesamt konnten nur 4 Nukleotidaustausche festgestellt werden. Die Zielsequenz enthielt 276 bp, und die Mutageneserate hätte nach drei PCR-Runden bei 1,47 % liegen sollen. Erwartet wurden demnach 4,05 Nukleotidaustausche pro Mutanten, d.h. ca. 36 in 9 Klonen.

Als mögliche Erklärung für die überraschend geringe Anzahl an Nukleotidaustauschen wurde eine Selektion der wildtypischen Aminosäuresequenz in Betracht gezogen, mit der zu rechnen wäre, falls der Großteil der Nukleotidaustausche zu einer Destabilisierung des LHCIIB-Komplexes geführt haben sollte. Bei 4 Nukleotidaustauschen pro Insert könnte ein destabilisierender Aminosäureaustausch ausreichen, um eine Selektion dieser Mutanten zu verhindern.

Als weitere mögliche Ursache für die geringe Anzahl an Nukleotidaustauschen in den selektierten Mutanten musste allerdings in Betracht gezogen werden, dass die Fehlerrate der Mutagenese-PCR überschätzt wurde, wie in Kap. 3.3.1.1 bestätigt werden konnte. In weiteren Experimenten wurden die Bedingungen der Mutagenese-PCR verändert, und der Effekt auf die Mutationsrate untersucht.

3.3.1.1 Bestimmung der bisherigen Mutationsrate

Um einen Eindruck von der Beschaffenheit der Mutantenbibliothek vor der Selektion zu gewinnen, wurden 29 Proteine aus einer dreifach mutierten Bibliothek überexprimiert und rekonstituiert. Lediglich eines der Proteine zeigte keinen Energietransfer bzw. keine grüne

Pigment-Protein-Komplexbande und war vermutlich durch ein frühes Stopcodon verkürzt (Daten nicht gezeigt, Überexpression und Energietransfer-Messungen durchgeführt von Vasileios K. im Rahmen eines Laborpraktikums unter Anleitung der Autorin).

Da ein unbekannter Anteil der Aminosäureaustausche keinen Effekt auf die Energietransferrate des LHCIIb hat, erlaubten die Ergebnisse der Energietransfermessung noch keine Rückschlüsse auf die Anzahl der Aminosäure- bzw. Nukleotidaustausche in den untersuchten Mutanten.

Aus der Anzahl der verkürzten Proteine ließ sich dagegen die Gesamtanzahl der Mutationen und damit die Fehlerrate berechnen. Dazu wurde zunächst bestimmt, welcher Anteil aller möglichen Mutationen zur Induktion eines Stopcodons führen würde. Für jede Position der Zielsequenz wurde überprüft, ob ein Austausch an dieser Stelle die Generation eines Stopcodons zur Folge hätte. Voraussetzung für diese Berechnung war die Annahme, dass pro Codon nur ein Nukleotidaustausch erfolgen konnte.

Anzahl der Nukleotide im mutierten Bereich	276 bp
Mögliche Mutationen pro Nukleotidposition	3
Anzahl der möglichen Mutationen im mutierten Bereich	828
Anzahl der Mutationen, die zu einem Stopcodon führen	33
Anteil der Stopmutationen an allen möglichen Mutationen	4%

Tab. 3.10: Grundlagen zur Berechnung der Mutationsrate aus der Anzahl der Stopmutanten.

Von den 29 exprimierten Proteinen war lediglich eines verkürzt. Da 4 % der insgesamt möglichen Mutationen ein Stopcodon zur Folge hatten (Tab. 3.10), konnte davon ausgegangen werden, dass insgesamt 25 Nukleotidaustausche vorlagen. Aus der Gesamtanzahl der möglichen Mutationen ließ sich die Mutationsrate abschätzen (Tab. 3.11).

Gesamtanzahl der Nukleotide: 29 x 276 = 8004		
Anzahl der PCR-Runden	verkürzte Proteine	Mutationsrate
3	1	0,31 %

Tab. 3.11: Berechnung der Mutationsrate aus der Anzahl der Stopmutanten.

In 29 Proteinen konnte lediglich ein verkürztes Protein beobachtet werden, was auf eine Mutationsrate von 0,31 % für drei PCR-Runden bzw. von 0,1 % pro PCR-Runde hindeutet. Dieser Wert ist allerdings nur ein grober Schätzwert, zum einen wurde nur ein einziges Ereignis beobachtet, zum anderen wurde die Induktion eines Stopcodons nicht durch Sequenzierung bestätigt. Die Verkürzung des Proteins kann demnach auch durch eine Leseraster-Verschiebung oder durch eine Deletion verursacht worden sein. Offensichtlich lag die Mutationsrate jedoch nicht wie erwartet bei 0,49 % pro PCR-Runde.

3.3.1.2 Bestimmung der Mutationsrate nach Verwendung eines anderen PCR-Puffers

Der bisher verwendete PCR-Puffer (20 mM Tris-HCl (pH 8,55); 16 mM (NH₄)SO₄; 2 mM MgCl₂) unterschied sich von den Puffern, die in vorherigen PCR-Mutagenesen verwendet wurden (Heinemann, 2000; Eggert, 2000; Christ, 1998). Im Folgenden wurden daher erneut Mutagenesen unter Verwendung eines ähnlicheren Puffers (10 mM Tris-HCl (pH 8,5); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂) durchgeführt. Die Nukleotidkonzentrationen (0,25 mM dATP/dGTP und 1,25 mM dCTP/dTTP), die MnCl₂-Konzentration (0,5 mM) sowie die Template-Konzentrationen (vgl. 3.2.1) wurden beibehalten.

Die Produkte nach einer bzw. zwei aufeinander folgenden Mutagenese-PCR-Runden (Primerpaare SphI_VM/XmaI_VM bzw. AB80-667/DS178^r und SphI_VM/XmaI_VM), wurden wie gehabt unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *Bst*EII und *Xma*I in das Expressionsplasmid C3.2h ligiert. Je 95 1- bzw. 2-fach mutierte Proteine wurden in Mikrotiterplatten überexprimiert. Die Produkte wurden in einer denaturierenden Gelelektrophorese aufgetrennt, und die Lhcb1-Proteine wurden in einem Western Blot nachgewiesen (Daten nicht gezeigt, Überexpression und Analyse durchgeführt von Vasileios K. unter Anleitung der Autorin).

Für 7-8 % der Mutanten konnte keine Lhcb1-Expression beobachtet werden und lediglich für eine der 2-fach mutierten Klone war ein verkürztes Protein nachweisbar. Wie in Tab. 3.12 berechnet, würde das einer Mutageneserate von 0,095 % für zwei PCR-Runden bzw. 0,0475 % pro PCR-Runde entsprechen.

Gesamtanzahl der Nukleotide: 95 x 276 = 26220

Anzahl der PCR-Runden	verkürzte Proteine	Mutationsrate
1	0	nicht bestimmbar
2	1	0,095 %

Tab. 3.12: Berechnung der Mutationsrate aus der Anzahl der Stopmutanten.

PCR-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8,5); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂

Auch durch Verwendung eines anderen PCR-Puffers ließ sich die Mutationsrate demnach nicht steigern. Tendenziell lag die Fehlerrate pro PCR-Runde sogar eher niedriger als unter den bisherigen Bedingungen (Kap. 3.3.1.1).

Steigerung der Mutationsrate durch erhöhte MgCl₂-Konzentrationen

Nach Cadwell et al., 1995 ist die Fehlerrate der Mutagenese-PCR nicht nur von der MnCl₂-Konzentration abhängig, sondern auch von der MgCl₂-Konzentration. Weitere Versuche zur Mutagenese-PCR wurden bei einer MgCl₂-Konzentration von 7 mM durchgeführt. Wie in Abb. 3.42 zu sehen, musste bei erhöhter MgCl₂-Konzentration mehr Plasmid-DNA eingesetzt werden, um ein PCR-Produkt zu erhalten.

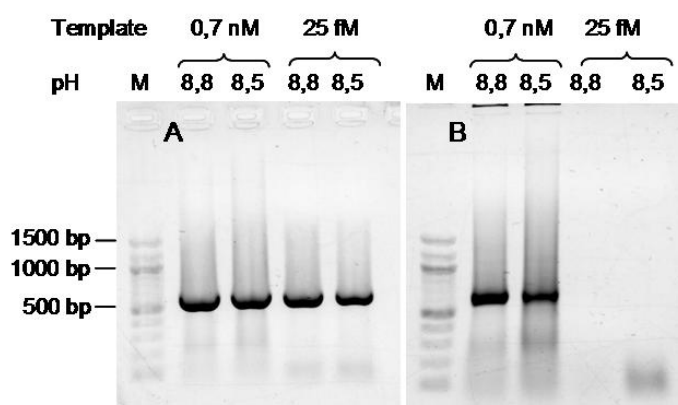


Abb. 3.42: Vergleich der PCR-Produkte unter normalen (A) und Mutagenese-Bedingungen (B).

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Normale Bedingungen (A): 10 mM Tris-HCl pH 8,8 bzw. 8,5; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; jeweils 0,2 mM dNTP; jeweils 4,4 µM Primer AB80-667 und DS178^r. Mutagenese-Bedingungen (B): wie A bis auf 7 mM MgCl₂; 0,25 mM dATP/dGTP und 1,25 mM dCTP/dTTP) und 0,5 mM MnCl₂. PCR-Programm: Hotstart, Zugabe von *Taq*-DNA-Polymerase (25 mU/µl) und MnCl₂ nach 5 min bei 95°C. 35 Zyklen: 60 sec 92°C; 60 sec 52°C; 90 sec 72°C. 10 min 72°C. M: 100 bp-Marker. Template: Lhcb1-Plasmid-DNA.

Im Gegensatz zu einer PCR unter normalen Bedingungen (A) war die Ausbeute der Mutagenese-PCR (B) abhängig von der eingesetzten Templatmenge. Bei Verwendung von

0,7 nM Template konnte ein Produkt der erwarteten Länge (550 bp) beobachtet werden, während mit einer Template-Konzentration von 25 fM kein Produkt zu beobachten war. Der pH-Wert schien ebenfalls einen Einfluss zu haben, bei pH 8,8 konnten mehr Amplifikate der gewünschten Länge erhalten werden als bei pH 8,5. Im Folgenden wurde die Mutagenese-PCR bei pH 8,8 durchgeführt.

In einem weiteren Experiment wurde die Mutagenese-PCR unter Verwendung verschiedener Template-Konzentrationen wiederholt.

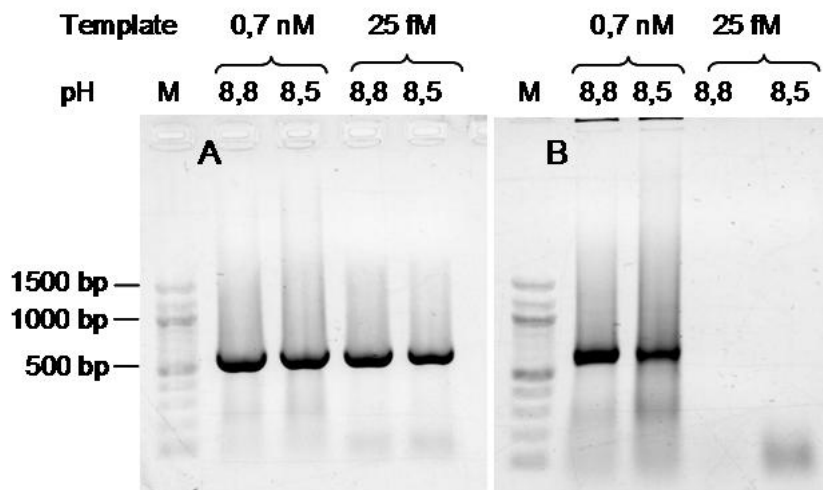


Abb. 3.43: Verschiedene Primerpaare und verschiedene Template-Konzentrationen.

Die Mutagenese-PCR wurde durchgeführt wie unter Abb. 3.42 B beschrieben. Die Template-Konzentration wurde wie angegeben variiert und es wurden zwei verschiedene Primer-Paare verwendet. M: 100 bp-Marker. Template: Lhcb1-Plasmid-DNA.

Wie in Abb. 3.43 zu sehen, musste die Template-Konzentration von 0,7 nM beibehalten werden, um ein Produkt der erwarteten Länge zu erhalten. Die Verwendung des Primerpaares DS23⁺/DS340⁻ erschien weniger geeignet als das Primerpaar AB80-667/DS178⁻. Mit DS23⁺ und DS340⁻ wurde ein Produkt der Länge 1092 bp erwartet, zusätzlich trat jedoch ein Fragment von ca. 700 bp Länge auf.

Unter den oben ermittelten Bedingungen wurden drei Mutagenese-PCR-Runden durchgeführt, wobei die Primer-Paare S2/DS340⁻ (Produkt: 967 bp), AB80-667/DS178⁻ (Produkt: 550 bp) und SphI_VM/XmaI_VM (Produkt: 314 bp) verwendet wurden. Als Template in die erste PCR-Runde wurde 0,7 nM Lhcb1-Plasmid-DNA eingesetzt. In die zweite PCR-Runde wurde das Produkt der ersten PCR als Template eingesetzt. Die DNA-Konzentration betrug dabei ebenfalls 0,7 nM. In der dritten PCR-Runde, mit dem Produkt der zweiten PCR als Template, musste die DNA-Konzentration um Faktor 10 auf 0,07 nM reduziert werden, um ein Produkt der gewünschten Länge zu erhalten (Daten nicht gezeigt).

Die Produkte der dritten Mutagenese-PCR-Runde wurden mit den Restriktionsenzymen *BstEII* und *XmaI* verdaut und in den Expressionsvektor C3.2h eingesetzt. 95 Proteine wurden überexprimiert und in denaturierenden SDS-Gelelektrophoresen aufgetrennt. Die Lhcb1-Proteine wurden in einem Western-Blot nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Wie in Kap. 3.3.1.1 beschrieben, wurde die Anzahl der verkürzten Proteine herangezogen, um die Fehlerrate zu bestimmen. Da geringe Verkürzungen des Proteins schwer zu erkennen waren, wurden nur Abbruchmutanten berücksichtigt, deren Expressionsprodukt kleiner als 20 kDa war.

Insgesamt konnten 14 Expressionsprodukte <20 kDa beobachtet werden. 8 der 95 Mutanten zeigten kein Expressionsprodukt.

Anzahl der Nukleotide	168 bp	
Mögliche Mutationen pro Nukleotidposition	3	
Anzahl der möglichen Mutationen im mutierten Bereich	504	
Anzahl der Mutationen, die zu einem Stopcodon führen	19	
Anteil der Stopmutationen an allen möglichen Mutationen	3,8 %	
Gesamtanzahl der Nukleotide: 95 x 168 = 15960		
Anzahl der PCR-Runden	verkürzte Proteine	Mutationsrate
3	14	2,3 %

Tab. 3.13: Berechnung der Mutationsrate aus der Anzahl der Stopmutanten.

PCR-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 50 mM KCl; 7 mM MgCl₂

Aus der Anzahl der Expressionsprodukte < 20 kDa konnte eine Mutationsrate von 2,3 % nach drei PCR-Runden, bzw. 0,77 % pro PCR-Runde berechnet werden. Durch Erhöhung der MgCl₂-Konzentration um Faktor 4,7 konnte demnach eine Steigerung der Fehlerrate um Faktor 16 erreicht werden.

3.3.2 Verkürzte Fusionsproteine

Bereits in Kap. 3.2.1.4.1 (Abb. 3.16) wurde das Auftreten verkürzter Fusionsproteine zusätzlich zu den Fusionsproteinen der erwarteten Länge bemerkt. In diesem Fall waren etwa genauso viele vollständige wie verkürzte Fusionsproteine nachweisbar. Das Verhältnis der vollständigen und verkürzten Fusionsproteine war jedoch sehr unterschiedlich, z. T. konnte das vollständige Produkt kaum noch nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Die Entstehung und die Identität dieser verkürzten Fusionsproteine blieben unklar. Es ist nicht bekannt ob es sich um Expressionsartefakte handelt, oder ob es während der weiteren Behandlung der Bakteriophagen zu dieser Verkürzung kam. Ebenfalls unbekannt ist, ob das beobachtete verkürzte Produkt einem N- oder C-terminalen Fragment des Fusionsproteins entspricht.

Bevorzugt trat das verkürzte Produkt in T7-Lhcb1-Konstrukten mit veränderter N-terminalen Sequenz des Lhcb1-Proteins (T7 GlySer und T7 GlySerSphI) auf. Bei Expression eines pLhcb1 war dagegen ein deutlich geringerer Anteil des verkürzten Fusionsproteins zu detektieren (Abb. 3.44).

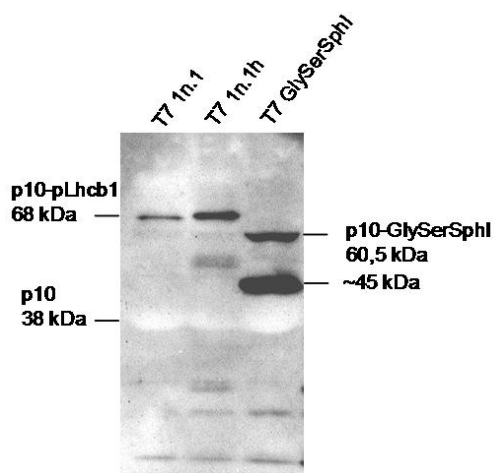


Abb. 3.44: Vergleich der Expressionsprodukte verschiedener T7 Lhcb1-Phagen.

Die verschiedenen Phagenlysate wurden wie in Kap. 2.5.4.2 hergestellt, durch Chloroform-Extraktion, Filtration und Pelletierung in einem Glyzeringradienten gereinigt. Die Bakteriophagenpellets wurden in Solubilisierungspuffer aufgenommen und weiterbehandelt wie die nicht-rekonstituierten unverdauten Kontrollen in Abb. 3.16. Die Lhcb1-Proteine wurden anschließend in einem Western Blot mit Anti-Lhcb1-Antikörper nachgewiesen. Vgl. Abb. 3.16.

Zwischen den verschiedenen T7 Lhcb1-Bakteriophagen zeigten sich deutliche Unterschiede in den Verhältnissen des vollständigen und des verkürzten Fusionsproteins. T7 GlySerSphI zeigte deutlich mehr verkürztes als vollständiges Fusionsprotein, während im Falle der Expression von pLhcb1-Proteinen wesentlich weniger verkürzte Fusionsproteine nachweisbar waren.

Nach Expression des pLhcb1 mit C-terminalem His-Tag (T7 1n.1h) zeigte sich ebenfalls ein Degradationsprodukt, das im Vergleich zu T7 GlySerSphI die gleiche Größenverschiebung aufwies, wie das vollständige Fusionsprotein. Die unterschiedlichen N-Termini der beiden Lhcb1-Proteine müssen offensichtlich in den jeweiligen verkürzten Produkten enthalten sein, was jedoch keine weiteren Rückschlüsse auf die Identität des verkürzten Fusionsproteins zulässt.

Ein Vergleich der T7 Lhcb1-Phagen T7 D7f.3 und T7 GlySer (Abb. 3.16) bestätigte den Eindruck, dass die Bildung des verkürzten Fusionsproteins durch längere N-Termini der exprimierten Lhcb1-Proteine vermieden wurde.

Daher wurde der Trypsin-sensitive N-Terminus bis einschließlich Y24 in einem weiteren T7 Lhcb1-Expressionsvektor durch ein Trypsin-resistentes Fragment von 66 Aminosäure aus der Zeaxanthin-Epoxidase von *Chlamydomonas reinhardtii* ersetzt.

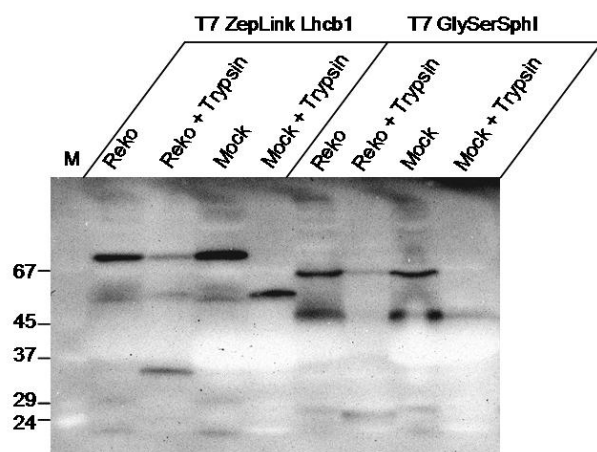


Abb. 3.45: Rekonstitution und Trypsinverdau von T7 ZepLink Lhcb1 und T7 GlySerSphI.

Herstellung und Reinigung der Lysate sowie die Rekonstitution durch Detergenswechsel (in Gegenwart von 1 mM DTT) wurden durchgeführt wie in Abb. 3.16 beschrieben. Reko: Detergenswechsel in Gegenwart von Pigmenten. Mock: Detergenswechsel ohne Pigmente. Der Trypsinverdau wurde mit Chymotrypsin-freiem Trypsin und ohne TPCK durchgeführt. Die Lhcb1-Proteine wurden in einem Western Blot durch Anti-Lhcb1-Antikörper nachgewiesen. Pro Lane wurden ca. 6×10^{11} Phagen eingesetzt. M: SDS7-Marker, die Molekulargewichte in kDa sind angegeben.

T7 ZepLink Lhcb1 zeigte im Vergleich zu T7 GlySerSphI wie erhofft deutlich mehr vollständiges Fusionsprotein (69 kDa) und deutlich weniger verkürztes Produkt (Abb. 3.45). Außerdem war wie erwartet nach Trypsinverdau der rekonstituierten Probe das Signal des vollständigen Fusionsproteins zu sehen, während es nach einem Verdau der nicht-rekonstituierten Probe fehlte. In diesem Fall (Mock + Trypsin) tauchte allerdings stattdessen ein sehr starkes Signal auf der Höhe von ca. 56 kDa auf. Die rekonstituierte und verdaute Probe (Reko + Trypsin) zeigte zusätzlich zu dem Signal des vollständigen Fusionsproteins ein Signal bei ca. 35 kDa und entsprach in diesem Punkt ebenfalls nicht den Erwartungen.

Eine Befürchtung bei der Herstellung von T7 ZepLink Lhcb1 war, dass nach Trypsinverdau der nicht-rekonstituierten Probe ein Signal bei ca. 42 kDa auftreten würde, was durch 36 Lhcb1-Aminosäurereste verursacht werden könnte, die keine basische Aminosäurereste und damit keine Trypsin-Schnittstelle enthalten. Dieses Signal war nicht zu beobachten, stattdessen trat ein Lhcb1-Fusionprotein mit einem Molekulargewicht von 56 kDa auf. Vor der Durchführung einer Selektion mit diesem Lhcb1-Vektor sollte daher zunächst untersucht

werden, ob dieses Protein mit der Phagenhülle assoziiert ist und ob ein solches Signal auch in der Gegenwart von Pigmenten zu beobachten ist.

3.4 Aminosäureaustausche in der luminalen Schleife

Lhcb1-Mutanten mit singulären Aminosäureaustauschen in der luminalen Schleife wurden bezüglich ihrer Stabilität verglichen. Dabei kamen verschiedene Methoden der Stabilitätsuntersuchung zum Einsatz. Das ursprüngliche Ziel dieser Untersuchungen war die Etablierung eines Durchmusterung-Systems, das die schnelle Identifizierung stabilisierter Lhcb1-Mutanten aus einer Phage-Display-Selektion ermöglichen sollte.

Wie schon in Kap. 3.2.3 beschrieben, zeigten bestimmte Aminosäureaustausche unter verschiedenen Bedingungen unterschiedliche Effekte auf die Stabilität der Pigment-Protein-Komplexe. Im Falle einiger Mutanten mit Aminosäureaustauschen in der luminalen Schleife ließen die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen Rückschlüsse auf die Ursache der Destabilisierung zu.

3.4.1 Herstellung der Mutanten

(durchgeführt von K. Eggert unter Anleitung von B. Heinemann)

Die verwendeten Lhcb1-Mutanten mit Einzelaminosäureaustauschen in der luminalen Schleifen-Domäne des LHCIIB wurden im Rahmen einer Zufallsmutagenese mit anschließender Selektion instabiler Mutanten gewonnen. Diese Methode war bereits mit Erfolg zur Identifizierung destabilisierender Aminosäureaustausche in der stromalen Schleifen-Domäne und der dritten Transmembranhelix angewandt worden (Heinemann et al., 1999).

Zur Induktion der Mutationen wurde eine PCR-basierte Methode verwendet (vgl. Kap. 3.2.1, EP-PCR-Puffer 4). Dabei wurde die Fehlerrate der DNA-Polymerase durch die Zugabe von Mn^{2+} -Ionen und durch unterschiedliche Konzentrationen der Nukleotide erhöht und sollte unter den gegebenen Bedingungen bei ca. 0,49 % pro PCR-Runde liegen (Shafikhani et al., 1997). Das Produkt der Mutagenese-PCR wurde über die *SacI*- und *SphI*-Restriktionsschnittstellen in 15h.10 ligiert. Das mutierte Fragment enthielt die gesamte luminal Schleifendomäne, die 5 C-terminalen Aminosäuren der ersten Helix sowie die erste Aminosäure von Helix 2 (L85 bis S123).

Um die größtmögliche Anzahl an Mutanten zu erhalten, in denen lediglich eine Aminosäure ausgetauscht war, wurden zwei aufeinander folgende PCR-Runden durchgeführt, wobei das Produkt der ersten PCR in 100-facher Verdünnung als Template für die zweite PCR eingesetzt wurde. Dadurch verdoppelte sich die erwartete Anzahl der Mutationen auf ca. 1 %. Das mutierte Fragment hatte eine Länge von 115 bp. Erwartet wurden demnach 1,15 % Nukleotidaustausche, wobei aufgrund des degenerierten genetischen Codes nicht jeder Nukleotidaustausch zu einem Aminosäureaustausch führte.

Bereits in Heinemann et al., 1999 wurde beobachtet, dass die Nukleotidaustausche nicht gleichmäßig verteilt waren, sondern dass A und T häufiger ausgetauscht wurden als G und C. Alle vier Nukleotide wurden jedoch gleich häufig induziert. Bei Herstellung der Mutanten mit Austauschen in der luminalen Schleife wurde ebenfalls eine Häufung der Austausche von A (30 %) und T (50 %) gegenüber den Austauschen von G (10 %) und C (10 %) beobachtet. Allerdings waren in diesem Fall die eingetauschten Nukleotide nicht gleich verteilt: A und T (34 % bzw. 32 %) wurden häufiger eingetauscht als G (19 %) und C (15 %), obwohl die Deoxynukleotidtriphosphate dGTP und dTTP in 5-fachem Überschuss gegenüber dATP und dCTP im PCR-Ansatz vorlagen.

Entsprechend dieser Ungleichverteilung war die Transversion von A nach T oder umgekehrt der häufigste Nukleotidaustausch (Tab. 3.14). Diese Tendenz wurde auch bei der Mutagenese von *Bacillus subtilis*-DNA unter gleichen Bedingungen beobachtet (Shafikhani et al., 1997).

	nach G	nach A	nach T	nach C
von G		5	1	0
von A	4		16	1
von T	6	13		8
von C	1	2	2	

Tab. 3.14: Nukleotidaustausche in sequenzierten Lhcb1-Mutanten.

3.4.2 Screening der Mutanten-Bibliothek

(durchgeführt von K. Eggert unter Anleitung von B. Heinemann)

Die mutierten Lhcb1-Proteine wurden in Mikrotiterplatten exprimiert und rekonstituiert (Heinemann et al., 1999). Als erstes Selektionskriterium diente die Energietransferrate. Dazu wurde das Verhältnis der Chl *a*- zu Chl *b*-Fluoreszenz (F_{680}/F_{660}) nach Chl *b*-Anregung (480 nm) bestimmt. Rekonstituierte LHCIIB-Komplexe zeigen Energietransfer von Chl *b* auf Chl *a*, während freie Pigmente keinen, oder einen deutlich geringeren Energietransfer zeigen sollten.

Von 96 Mutanten auf einer Mikrotiterplatte wurden die 10 ausgewählt, die das niedrigste F_{680}/F_{660} -Verhältnis zeigten. Diese Mutanten wurden in 5 ml-Ansätzen exprimiert und durch Detergenswechsel in Gegenwart von 1 mM DTT und 0,13 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Gesamt-xanthophyll rekonstituiert.

Nur die Mutanten, die in drei unabhängigen Experimenten keine grünen Pigment-Protein-Komplexbanden nach einer schwach denaturierenden LDS-Gelelektrophorese zeigten, wurden als instabil angesehen. Von 4300 analysierten Mutanten zeigten 140 entweder keine Überexpression oder Proteine, die durch Induktion eines Stopcodons verkürzt waren. 33 Lhcb1-Mutanten, allerdings, hatten die gewünschte Länge, zeigten aber keine grünen Pigment-Protein-Komplexbanden nach der Gelelektrophorese. Die Plasmid-DNA dieser 33 Lhcb1-Mutanten wurde isoliert und sequenziert (Tab. 3.15).

Mutanten mit einem Austausch (15)*	Mutanten mit zwei Austauschen (10)	Mutanten mit drei Austauschen (3)	Mutanten mit vier Austauschen (1)
S86P	L85M/S102F	S86P/E107K/L113M	K91I/E94G/F98Y/L118S
G89S	V90D/W97G	V90A/K91I/I104F	
E94G (2)**	V90G/E94V	F98L/Q103L/H120L	
W97R (3)**	K91I/W97R		
G101R	W97C/A121G		
S102T	F98Y/Q122L		
E107V	S102P/S123G		
G109R	F105L/L113M		
D111V	L113S/N115K		
G114D	V119A/Q122L		
N115Y			
H120L			
H120Y			
Q122H			
Q122L (2)**			

Tab. 3.15: Aminosäureaustausche in sequenzierten Lhcb1-Mutanten.

* Anzahl verschiedener Aminosäureaustausche.

** Anzahl der Mutanten mit identischen Aminosäureaustauschen.

In 19 dieser 33 Mutanten war lediglich eine Aminosäure ausgetauscht, wobei 3 dieser Austausche in mehreren unabhängigen Experimenten beobachtet wurden. Insgesamt wurden bis zu vier Aminosäuren in einer Mutante ausgetauscht. In diesen multiplen Mutanten war keine Aussage darüber möglich, welche Mutation die Destabilisierung verursachte. Entsprechend wurden nur die Mutanten mit singulären Aminosäureaustauschen weiter untersucht. Abbildung 3.46 zeigt die Verteilung der Aminosäureaustausche im *SacI-SphI*-Fragment, wobei die unterschiedliche Färbung der Balken kennzeichnet, ob eine Aminosäure in einer singulären oder multiplen Mutante ausgetauscht wurde.

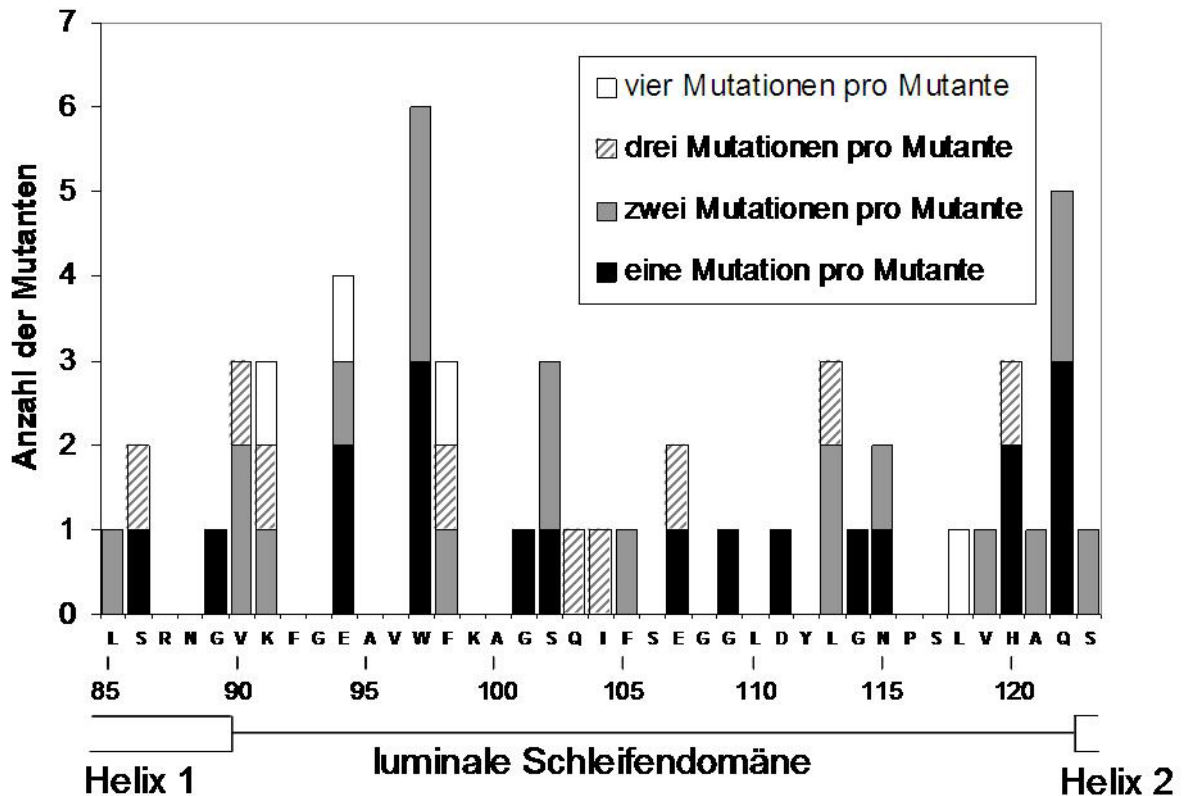


Abb. 3.46: Verteilung der Aminosäureaustausche.

Dargestellt ist das gesamte *SacI-SphI*-Fragment (Nummerierung nach Kühlbrandt et al., 1994). Die Bereiche mit unterschiedlicher Sekundärstruktur sind gekennzeichnet. Die Anzahl der Mutanten, in denen eine bestimmte Aminosäure ausgetauscht wurde, ist auf der y-Achse aufgetragen. Die Anzahl der Aminosäureaustausche pro Mutante wurde durch unterschiedliche Färbung der Balken gekennzeichnet.

Die Aminosäureaustausche waren gleichmäßig über den gesamten mutierten Bereich verteilt, eine besondere Häufung von Austauschen in bestimmten Regionen der Zielsequenz wurde nicht beobachtet.

In Tabelle 3.16 wurde die Häufigkeit der Austausche für Aminosäuren eines chemischen Typs berechnet. Dabei wurden ausschließlich singuläre Mutanten berücksichtigt. Bezogen auf ihr Auftreten in der Zielsequenz wurden polare, insbesondere saure Aminosäuren häufiger ausgetauscht als hydrophobe Aminosäuren. Häufig wurde auch der Austausch eines Glycins beobachtet, während lediglich eine hydrophobe Aminosäure ausgetauscht wurde. Der Austausch einer basischen Aminosäure wurde nicht beobachtet.

	hydrophob	polar	sauer	basisch	Glycin
Anzahl in der Zielsequenz	16	11	3	3	6
Anzahl der Austausch in singulären Mutanten	1	5	3	0	4
% Austausch	6	45	100	0	67

Tab. 3.16: Häufigkeit der Austausch von Aminosäuren eines bestimmten chemischen Typs.

3.4.3 Vergleichende Stabilitätsuntersuchungen

Die unter 3.4.2 beschriebenen Mutanten zeigten nach einer Detergenswechsel-Rekonstitution und anschließender schwach denaturierender LDS-Gelelektrophorese keine grünen Pigment-Protein-Komplexbanden. Die Ursache konnte zum einen in einer verminderten Rekonstitutionsfähigkeit liegen, zum anderen würde aber auch eine mangelnde Stabilität der Pigment-Protein-Komplexe zu diesem Ergebnis führen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass alle isolierten Lhcb1-Mutanten in der Lage waren, Pigment-Protein-Komplexe zu bilden. Diese Pigment-Protein-Komplexe unterschieden sich jedoch deutlich in ihrer Stabilität und zeigten zum Teil unterschiedliches Verhalten in verschiedenen Stabilitätsuntersuchungen.

3.4.3.1 Schwach denaturierende Gelelektrophorese

Wie schon in Kap. 3.2.3.1 beschrieben, wurden durch Kombination zweier Rekonstitutionsmethoden (Frier-Tau-Zyklen und Detergenswechsel) und zweier verschiedener Elektrophoresepuffer (Deriphat- und LDS-Laufpuffer) unterschiedliche Stringenzstufen der schwach denaturierenden Gelelektrophorese erreicht.

Die Rekonstitutionsansätze enthielten 10 mM DTT und 0,4 µg/µl Xanthophyll, Bedingungen, die die Ausbeute an Pigment-Protein-Komplexen steigerten (Kap. 3.2.3.1.1). Tatsächlich konnten unter diesen Bedingungen, im Gegensatz zu Kap. 3.4.2, für einige Mutanten auch nach Detergenswechselrekonstitution und LDS-PAGE grüne Pigment-Protein-Komplexbanden beobachtet werden (Abb. 3.47 A). Bei Verwendung des Deriphat-Laufpuffers zeigten alle Lhcb1-Mutanten bis auf W97R grüne Pigment-Protein-Komplexbanden (Abb. 3.47 C). Die schwach denaturierenden Gelelektrophoresen wurden von Sonja G. im Rahmen einer Diplomarbeit unter Anleitung der Autorin durchgeführt.

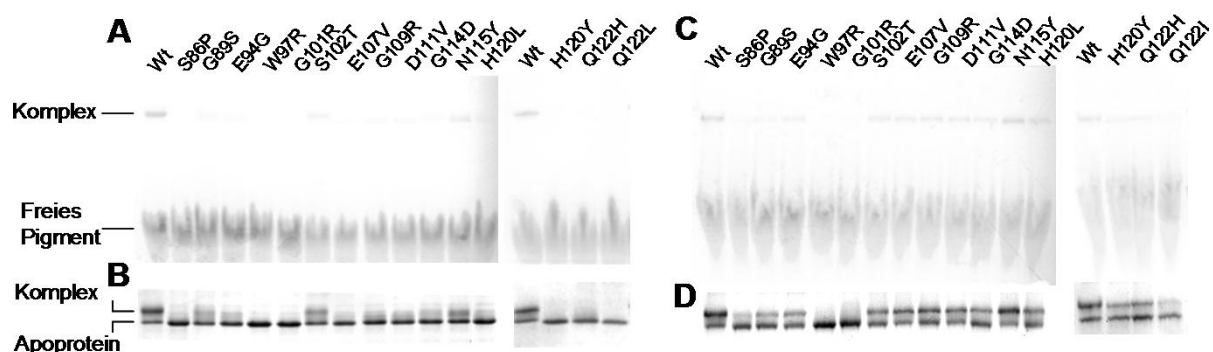


Abb. 3.47: Schwach denaturierende PAGE nach Detergenswechselrekonstitution.

Lhcb1-Mutanten wurden durch Detergenswechsel rekonstituiert (100 mM Tris-HCl (pH 9); 12,5 % Saccharose; 2 % LDS; 10 mM DTT; 0,4 µg/µl Gesamtxanthophyll) und in einer schwach denaturierenden Gelelektrophorese mit LDS- (A/B) oder Deriphat-Laufpuffer (C/D) auf 15 % Polyacrylamidgelen aufgetrennt. In Abbildungsteil B und D sind die Gele nach einer Coomassie-Färbung gezeigt.

Um die Ausbeuten an Pigment-Protein-Komplexen zu vergleichen, wurden die Intensitäten der Proteinbanden nach einer Coomassie-Färbung (Abb. 3.47 B/D) bestimmt. Der Anteil der Pigment-Protein-Komplexbande, bezogen auf die Summe von Pigment-Protein-Komplex-

und Apoproteinbande wurde als relative Intensität der Komplexbande angegeben. Dabei ist zu beachten, dass diese relative Komplexbandenintensität nicht gleichzusetzen ist mit der tatsächlichen Ausbeute an Pigment-Protein-Komplexen, da die Grünfärbung der Komplexbande ebenfalls zu ihrer Intensität beiträgt.

Wie in Abb. 3.48 zu sehen, zeigte Lhcb1-Wildtyp die höchste Ausbeute nach Frier-Tau-Rekonstitution und Deriphat-PAGE. Unter anderen Bedingungen wurden nur 78 bis 86 % dieser Ausbeute erreicht. Eine erhöhte Ausbeute der Frier-Tau-Rekonstitution im Vergleich zur Rekonstitution durch Detergenswechsel für Lhcb1-Wildtyp wurde bereits beschrieben (Paulsen et al., 1993).

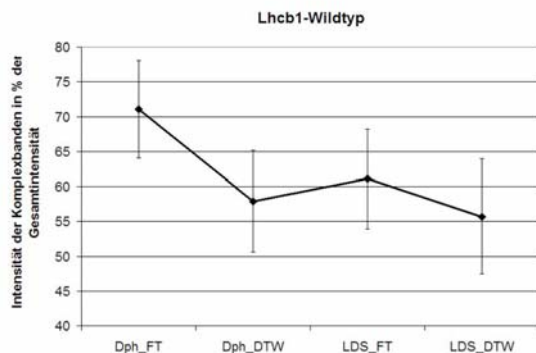


Abb. 3.48: Relative Komplexbandenintensität für Lhcb1-Wildtyp unter verschiedenen Bedingungen.

Lhcb1-Wildtyp wurde in Gegenwart von 10 mM DTT und 0,4 µg/µl Xanthophyll durch Frier-Tau-Zyklen (FT) oder Detergenswechsel (DTW) rekonstituiert. Die rekonstituierten Komplexe wurden in einer LDS- (LDS) oder Deriphat- (Dph) PAGE aufgetrennt. Die Intensitäten der Apoprotein- und Komplexbanden nach Coomassie-Färbung wurden bestimmt und zu 100 % addiert. Die relativen Intensitäten der grünen Pigment-Protein-Komplexbanden wurden berechnet und auf der y-Achse aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 4-6 unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen wurden als Fehlerbalken angegeben.

Im Gegensatz zu Lhcb1-Wildtyp war der Ertrag an Pigment-Protein-Komplexen im Falle der verschiedenen Lhcb1-Mutanten sehr stark von den jeweiligen Bedingungen abhängig. Abb. 3.49 zeigt die relativen Komplexbandenintensitäten der Mutanten, bezogen auf die Intensität des Wildtyps unter gleichen Bedingungen.

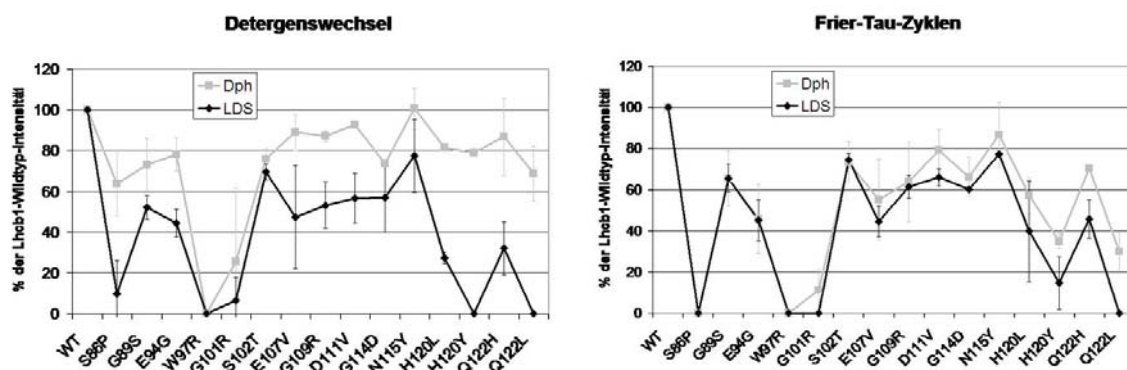


Abb. 3.49: Relative Komplexbandenintensität bezogen auf die WT-Intensität.

Lhcb1-Mutanten wurden in Anwesenheit von 10 mM DTT und 0,4 µg/µl Gesamt-xanthophyll durch Detergenswechsel oder Frier-Tau-Zyklen rekonstituiert. Nach schwach denaturierender Gelelektrophoresen mit LDS- (LDS) oder Deriphat- (Dph) Laufpuffer wurden die relativen Intensitäten der Komplexbanden wie in Abb. 3.48 bestimmt und auf die Intensität des Lhcb1-Wildtyps unter gleichen Bedingungen bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2-3 Experimenten. Die Standardabweichungen wurden als Fehlerbalken angegeben.

Die höchsten Erträge an Pigment-Protein-Komplexen wurden im Falle der Lhcb1-Mutanten nach Detergenswechselrekonstitution und Deriphat-Gelelektrophorese erreicht. Unter diesen Bedingungen zeigten nur W97R und G101R deutlich reduzierte Komplexbandenintensitäten,

während die verbleibenden Mutanten 60 bis 90 % der Wildtyp-Intensität erreichten. Eine Mutante, N115Y, erreichte unter diesen Bedingungen die gleiche Komplexbandenintensität wie Lhcb1-Wildtyp. Alle Mutanten zeigten nach Rekonstitution durch Frier-Tau-Zyklen und/oder LDS-PAGE geringere Intensitäten. Unter diesen Bedingungen zeigten sich auch größere Unterschiede zwischen den Mutanten als nach Detergenswechsel-Rekonstitution und Deriphat-PAGE (Abb. 3.49 graue Linie).

Anhand der unterschiedlichen Ergebnisse der Deriphat- und der LDS-PAGE nach einer Detergenswechselrekonstitution ist die unterschiedliche Stringenz der beiden Elektrophoresesysteme zu erkennen. Die relativen Intensitäten, die in den beiden Elektrophoresesystemen bestimmt werden konnten, standen allerdings in keiner Beziehung zueinander (Abb. 3.50). Anhand ihrer Position in Abb. 3.50 wurden die Mutanten in vier Stabilitätsgruppen unterteilt.

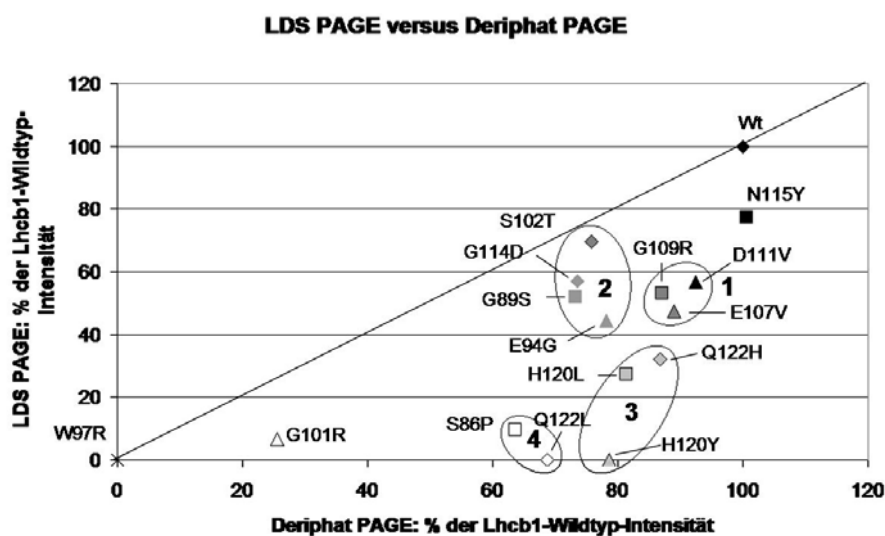


Abb. 3.50: Einteilung der Stabilitätsgruppen.

Die relativen Komplexbandenintensitäten nach Deriphat- bzw. LDS-PAGE wurden auf x- und y-Achse aufgetragen. Dargestellt sind die Werte aus Abb. 3.49 nach Detergenswechselrekonstitution. Mutanten mit ähnlichen Intensitäten wurden in Stabilitätsgruppen zusammengefasst (nummerierte Ellipsen). Schwarze Linie: $x = y$.

Für den Großteil der Mutanten lag die Ausbeute nach Deriphat-PAGE zwischen 60 und 90 % der Lhcb1-Wildtyp-Intensität, wohingegen die Werte nach LDS-PAGE zwischen 0 und 70 % der Wildtyp-Intensität schwankten. Die Mutanten der Stabilitätsgruppe 1 zeigten sowohl nach Deriphat- (80-90 %) als auch nach LDS-PAGE (50 %) die höchsten Ausbeuten. Für Mutanten der Gruppe 2 konnten nach LDS-PAGE ähnlich hohe Ausbeuten bestimmt werden, die Intensitäten nach Deriphat-PAGE waren jedoch deutlich geringer (70-80 %). Mutanten der Stabilitätsgruppen 3 und 4 erbrachten in einer LDS-PAGE weniger als 40 % der Wildtyp-Intensität, unterschieden sich jedoch deutlich in den Ausbeuten im Deriphat-System (80-90 % bzw. 60-70 %). Die Mutanten W97R und G101R wurden keiner Stabilitätsgruppe zugeordnet. Sie zeigten nur sehr schwache Pigment-Protein-Komplexbanden nach einer elektrophoretischen Auftrennung und unterschieden sich damit von Mutanten der Stabilitätsgruppe 4, die zumindest nach Deriphat-PAGE über 60 % der Wildtyp-Intensität erreichten. Im Falle von N115Y wurde ebenfalls auf eine Gruppierung verzichtet, da diese Mutante sowohl nach Deriphat- als auch nach LDS-PAGE eine höhere Pigment-Protein-Komplex-Ausbeute zeigte als die Mutanten der Stabilitätsgruppe 1.

3.4.3.2 Dissoziationskinetiken der LHCIIB-Mutanten bei 37°C

Abb. 3.50 zeigt deutlich, dass zwischen den Ausbeuten an Pigment-Protein-Komplexen nach LDS- und Deriphat-PAGE kein Zusammenhang besteht. Eine mögliche Erklärung wäre die unterschiedliche Gewichtung der Rekonstitutionsausbeute und der Stabilität der entstandenen Komplexe. Unter den weniger stringenten Bedingungen der Deriphat-PAGE spielte möglicherweise die Ausbeute der Rekonstitution eine größere Rolle als die Stabilität der Pigment-Protein-Komplexe.

Um zu überprüfen, ob die relativen Komplexbandenintensitäten nach Deriphat-PAGE ebenfalls die Stabilität der Komplexe widerspiegeln, oder ob Unterschiede lediglich auf unterschiedliche Ausbeuten der Rekonstitution zurückzuführen sind, wurden Dissoziationskinetiken der LHCIIB-Mutanten bei 37°C aufgenommen. Wie in Yang et al., 1999 beschrieben, wurde die Dissoziation als Rückgang des Energietransfers verfolgt, der sich bei Anregung von Chl *b* als Rückgang der Chl *a*-Fluoreszenz äußert. Wie in Kap. 3.2.3.2 beschrieben, kann der Rückgang der Chl *a*-Fluoreszenz durch eine Zerfallsfunktion erster Ordnung angepasst und auf diese Weise die Halbwertszeit bestimmt werden. Alle Lhcb1-Mutanten, sogar W97R, zeigten zu Beginn der kinetischen Messung Energietransfer von Chl *b* auf Chl *a*, im Gegensatz zu einer Probe ohne Protein. Nach der kinetischen Messung konnte kein Energietransfer mehr beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Der Rückgang der Chl *a*-Fluoreszenz war von einem Anstieg der Chl *b*-Fluoreszenz begleitet, es konnte also davon ausgegangen werden, dass alle untersuchten Lhcb1-Mutanten in der Lage waren zu rekonstituieren.

Abbildung 3.51 zeigt die ermittelten Halbwertszeiten, dargestellt in Abhängigkeit von der Komplexbandenintensität nach Detergenswechselrekonstitution und Deriphat-PAGE.

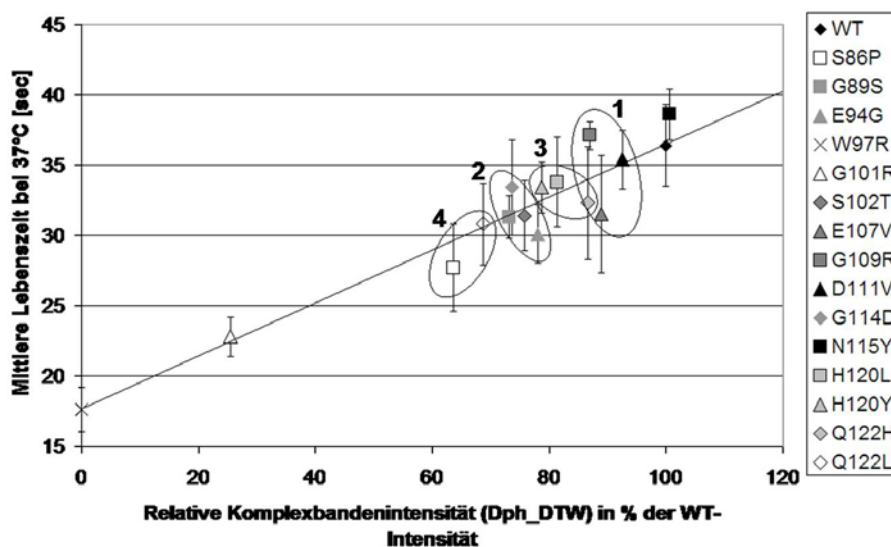


Abb. 3.51: Korrelation der mittleren Lebenszeit bei 37°C und der relativen Komplexbandenintensität nach Detergenswechselrekonstitution und Deriphat-PAGE.

Die Lhcb1-Mutanten wurden durch Detergenswechsel (1 mM DTT; 0,13 µg/µl Xanthophyll) rekonstituiert und für die Messung um Faktor 60 in 1 % OG; 10 % Glyzerin; 0,1 M Tris-HCl (pH 7) verdünnt. Nach Verdünnung in eiskaltem Puffer und 5 min Inkubation auf Eis wurden die Proben in die vorgewärmte (37°C) Küvette des Fluoreszenzspektrometers eingefüllt und die Messung gestartet. Anregungswellenlänge: 470 nm. Die Chl *a*- (680 nm) und die Chl *b*- (660 nm) Fluoreszenzen wurden verfolgt. Der Rückgang der Chl *a*-Fluoreszenz wurde durch eine Zerfallsfunktion erster Ordnung angepasst, aus deren Zeitkonstanten die mittlere Lebensdauer bestimmt werden konnte (vgl. Kap. 3.2.3.2). Dargestellt (y-Achse) sind die Mittelwerte aus 3-4 Messungen mit Standardabweichungen (Fehlerbalken). Auf der x-Achse wurden die relativen Komplexbandenintensitäten nach Detergenswechselrekonstitution und Deriphat-PAGE (Abb. 3.49) aufgetragen. Die nummerierten Ellipsen kennzeichnen die Stabilitätsgruppen aus Abb. 3.50.

Die berechneten mittleren Lebenszeiten korrelierten mit den relativen Komplexbandenintensitäten nach Detergenswechsel und Deriphat-PAGE, wobei die Stabilitätsgruppen 1-4 relativ ähnliche Lebenszeiten zeigten. Für Stabilitätsgruppe 3 bestätigten die mittleren Lebenszeiten die Ergebnisse der Deriphat-PAGE, während nach LDS-PAGE für diese Gruppe deutlich schwächere Komplexbanden beobachtet werden konnten als für Gruppe 2.

Da die mittleren Lebenszeiten unabhängig von den Rekonstitutionsausbeuten sind und lediglich durch die Stabilität der Komplexe beeinflusst werden, sind die unterschiedlichen Komplexbandenintensitäten nach Detergenswechselrekonstitution und Deriphat-PAGE genau wie die Ergebnisse nach LDS-PAGE auf unterschiedliche Stabilitäten der Pigment-Protein-Komplexe zurückzuführen. Da die Ergebnisse nach LDS- und Deriphat-PAGE jedoch in keinem Zusammenhang stehen (Abb. 3.50), ist davon auszugehen, dass während dieser beiden Elektrophorese-Methoden unterschiedliche Aspekte der Stabilität zum Tragen kommen.

Wie oben erwähnt, konnten keine signifikanten Unterschiede der mittleren Lebenszeiten von Mutanten verschiedener Stabilitätsgruppen beobachtet werden. Dagegen scheint die Position des Aminosäureaustausches die thermische Stabilität der Mutanten zu beeinflussen (Abb. 3.52).

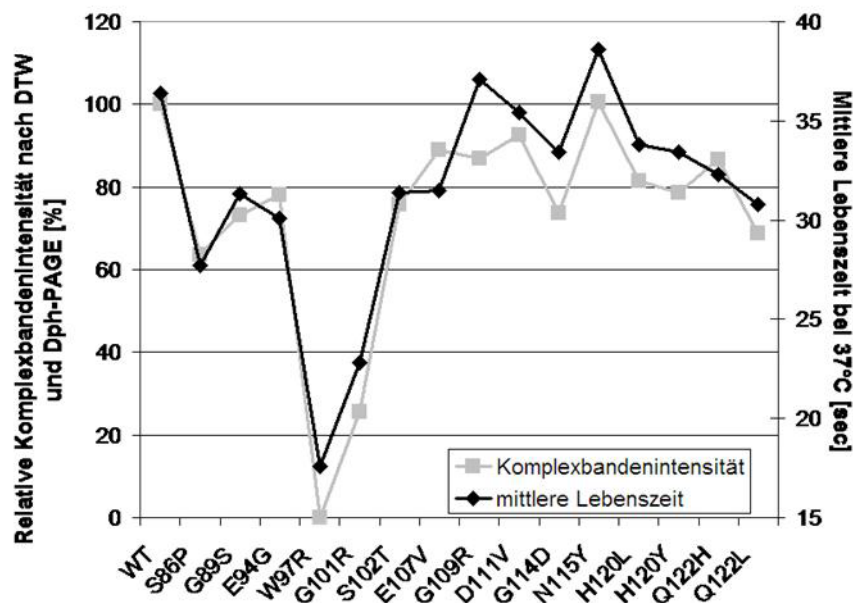


Abb. 3.52: Positionaler Effekt der thermischen Stabilität.

Mittlere Lebenszeiten (sekundäre y-Achse) und relative Komplexbandenintensitäten (primäre y-Achse) aus Abb. 3.51 wurden als Liniendiagramm dargestellt, wobei die Mutanten entsprechend der Position des Aminosäureaustausches aufgetragen sind.

Dabei zeigen Mutanten mit Austauschen in der ersten Hälfte der luminalen Schleifendomäne bis einschließlich Position E107 tendenziell eine geringere thermische Stabilität als Mutanten mit Austauschen in der zweiten Hälfte der Schleifendomäne (Abb. 3.52).

3.4.3.3 Zugänglichkeit der luminalen Schleifendomäne für tryptische Spaltungen

Die Endoprotease Trypsin spaltet Polypeptidketten an basischen Aminosäuren, wobei die C-proximale Verknüpfung zur nächsten Aminosäure gelöst wird. Die luminalen Schleifendomäne enthält zwei basische Aminosäuren (K91 und K99), die eine tryptische Spaltung erlauben würden, eine weitere befindet sich am C-proximalen Ende der ersten Transmembranhelix (R87). In wildtypischen LHCIb-Komplexen sind diese Schnittstellen allerdings vor einem

proteolytischen Angriff geschützt. Lediglich am N-Terminus der Polypeptidkette spaltet Trypsin etwa 14 Aminosäuren ab, so dass ein stabiles Degradationsprodukt von 24 kDa verbleibt (Paulsen et al., 1993).

Abb. 3.53 zeigt, dass nach einem tryptischen Verdau der rekonstituierten Lhcb1-Mutanten zusätzlich zu dem 24 kDa-Degradationsprodukt ein weiteres Produkt von etwa 14-15 kDa auftauchte. Besonders prominent war dieses verkürzte Degradationsprodukt in den Mutanten W97R und G101R, in denen dagegen die Menge des 24 kDa-Degradationsproduktes deutlich reduziert war.

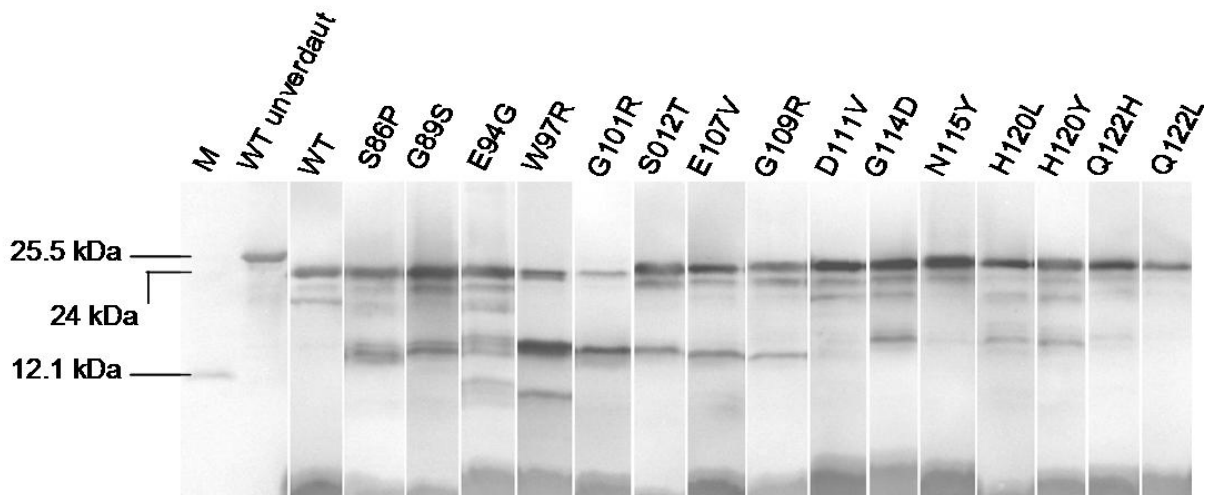


Abb. 3.53: Lhcb1-Nachweis (Western Blot) nach Detergenswechselrekonstitution und Trypsin-Verdau.

Nach einer Detergeswechselrekonstitution (1 mM DTT; 0,13 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Gesamtxanthophyll) wurden die Komplexe mit 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Trypsin für 25 min bei 25°C verdaut. Nach einer Auftrennung in einer denaturierenden SDS-PAGE (Schägger et al., 1987) wurde Lhcb1 in einem Western Blot mit Anti-Lhcb1-Antikörper nachgewiesen. 0,75 μg unverdautes Lhcb1 (WT), und 0,2 μg eines verkürzten Lhcb1-Protein mit 12,1 kDa (39a.2) wurden als Molekulargewichtsmarker (M) verwendet. Die Proteinmenge der verdauten Proben entsprach 3 μg Protein vor dem Verdau.

Der Abbau des 24 kDa-Degradationsproduktes wurde für alle Mutanten innerhalb von 120 min verfolgt (Daten nicht gezeigt). Mit Ausnahme der Mutanten W97R und G101R erfolgte dieser Abbau jedoch zu langsam um signifikante Unterschiede zwischen den Mutanten beobachten zu können.

Abb. 3.54 zeigt die Verdaukinetiken für Wildtyp-Lhcb1 und die Mutanten W97R und G101R, die bestätigten, dass das 14-15 kDa Fragment tatsächlich auf Kosten des 24 kDa-Degradationsproduktes zunahm. In W97R konnte innerhalb von 60 min bereits ein Abbau des 14-15 kDa-Fragmentes beobachtet werden, an seiner Stelle trat ein Fragment mit einem Molekulargewicht von unter 12,1 kDa auf, das vermutlich durch eine weitere tryptische Spaltung des 14-15 kDa-Fragmentes entstanden war.

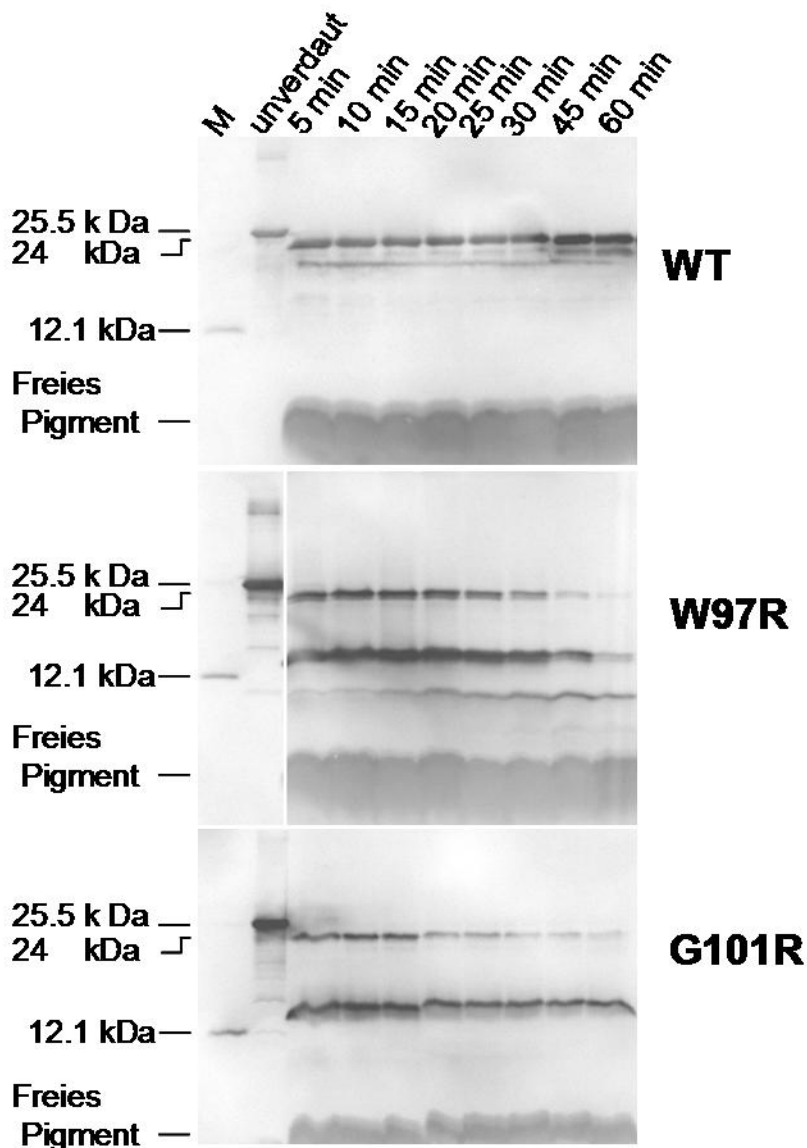


Abb. 3.54: Verdaukinetiken für Lhcb1-Wildtyp (WT), W97R und G101R.

Während eines Trypsinverdaus der rekonstituierten Komplexe (Bedingungen wie in Abb. 3.53) wurden Proben zu unterschiedlichen Zeiten entnommen. Lhcb1 wurde in einem Western Blot nachgewiesen (vgl. Abb. 3.53). Proteinmengen wie in Abb. 3.53. WT: Lhcb1-Wildtyp; M: 12,1 kDa-Lhcb1 (39a.2).

Da alle untersuchten Mutanten in der luminalen Schleifendomäne verändert wurden, lag die Vermutung nahe, dass durch die Aminosäureaustausche die Zugänglichkeit der luminalen Schleife für Trypsin erhöht wurde. Eine Spaltung an K99 würde zu zwei Fragmenten von 9,4 kDa (N-terminal) und 14,6 kDa (C-terminal) führen. Um zu testen, ob es sich bei dem beobachteten 14-15 kDa-Fragment um das C-terminale Fragment handelte, wurde der C-Terminus von W97R durch einen His₆-tag verlängert. Falls das 14-15 kDa Fragment den C-Terminus enthält, müsste dieses Degradationsprodukt von W97Rhis länger sein als das von W97R. In Abb. 3.55 ist zu sehen, dass das tatsächlich der Fall war, das 14-15 kDa-Fragment war im Falle der Mutante mit dem C-terminalen His₆-Tag länger als bei der Mutante ohne die C-terminale Verlängerung. Allerdings zeigte auch das <12,1 kDa-Fragment die C-terminale Verlängerung, konnte also nicht das erwartete N-terminale Fragment darstellen.

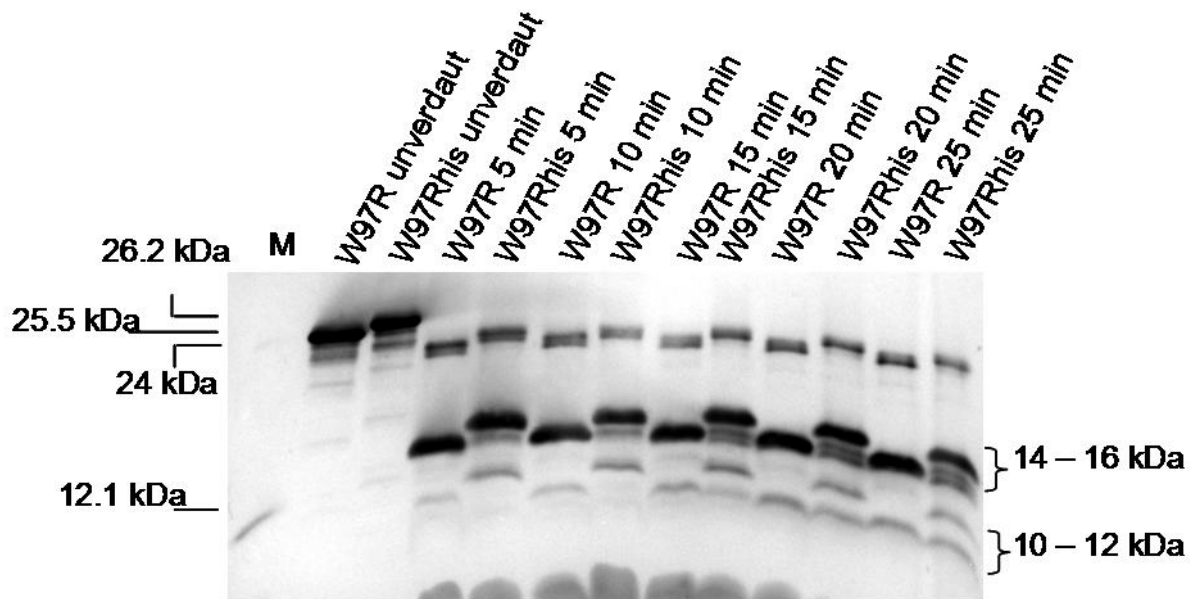


Abb. 3.55: Vergleich der Degradationsprodukte von W97R und W97Rhis.

W97R und eine W97R-Mutante mit C-terminalem His₆-Tag (W97Rhis) wurden rekonstituiert und verdaut, wie in Abb. 3.53 beschrieben. Zu unterschiedlichen Zeiten während des Trypsinverdaus wurden Proben entnommen, W97R und W97Rhis sind jeweils in benachbarten Taschen aufgetragen. 0,54 µg unverdautes Lhcb1-Wildtyp-Protein (WT) und 0,2 µg des verkürzten Lhcb1-Proteins (M, vgl. Abb. 3.53) wurden als Molekulargewichtsmarker verwendet. Die Proteinmenge der verdauten Proben entspricht 2,1 µg Protein vor dem Verdau. WT: Lhcb1-Wildtyp; M: 12,1 kDa Lhcb1 (39a.2).

Vermutlich erfolgte der Abbau des N-terminalen Fragmentes durch weitere tryptische Spaltungen zu schnell, ein Nachweis war nicht möglich. Das beobachtete C-terminale Fragment mit einem Molekulargewicht von <12,1 kDa ist vermutlich ein Abbauprodukt des 14-15 kDa-Fragmentes. Die nächste basische Aminosäure nach der luminalen Schleifenregion ist R142. Eine Spaltung an dieser Aminosäure würde zu einem 10 kDa C-terminalen Fragment führen, das vermutlich identisch mit dem beobachteten <12,1 kDa Fragment ist. Die Tatsache, dass ein C-terminales Fragment des Lhcb1 bestehen bleibt, obwohl der Großteil des Polypeptides bereits abgebaut wurde, impliziert, dass der erste Schnitt in der luminalen Schleifendomäne nicht zum sofortigen und vollständigen Zerfall der Komplex-Struktur führt, da in diesem Fall die gesamte Polypeptidkette Trypsin-sensitiv werden würde. Daraus ist zu schließen, dass die Mutationen zu einer erhöhten Trypsin-Zugänglichkeit der luminalen Schleifendomäne führen, ohne die Komplexstruktur völlig zu zerstören.

Im Falle von W97Rhis erschienen zusätzlich zu den verlängerten Degradationsprodukten auch Degradationsprodukte, die in ihrer Länge denen von W97R entsprachen. Das bestätigte frühere Beobachtungen, dass der C-terminale His₆-Tag mit der Zeit durch Trypsin abgespalten werden kann.

Um einen Vergleich der Ergebnisse des Trypsinverdaus mit den bisherigen Ergebnissen zu ermöglichen, wurde der relative Anteil des 14-15 kDa Produktes im Vergleich zu der Menge an 24 kDa-Degradationsprodukt berechnet (Abb. 3.56).

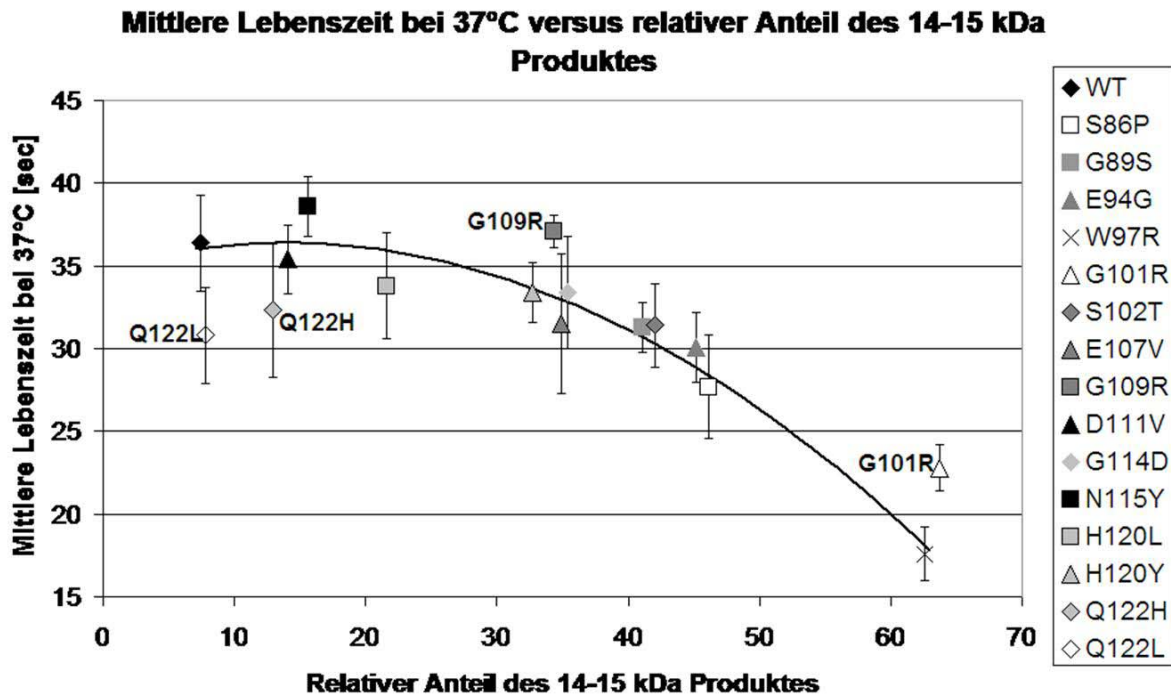


Abb. 3.56: Relativer Anteil des 14-15 kDa Produktes und mittlere Lebenszeit bei 37°C.

Die Intensität des 24 kDa-Signals und des 14-15 kDa-Signals (plus des 10 kDa-Signals im Falle von W97R) nach 25 min Trypsin-Verdau (Abb. 3.53) wurde zu 100 % addiert und die relative Intensität des 14-15 kDa wurde berechnet und auf der x-Achse aufgetragen. Auf der y-Achse wurden die mittleren Lebenszeiten bei 37°C (Abb. 3.51) abgebildet. Bei der Berechnung der Korrelationskurve (schwarze Linie) wurden die vier namentlich gekennzeichneten Datenpunkte nicht berücksichtigt.

Bis auf vier Ausnahmen (G101R, G109R, Q122H, Q122L) zeigten die Ergebnisse der Dissoziationskinetik bei 37°C und des Trypsinverdaus eine sehr gute Übereinstimmung. Es scheint daher ein direkter Zusammenhang zwischen der Trypsin-Sensitivität der luminalen Schleifen-Domäne und der mittleren Lebenszeit bei 37°C zu bestehen, die wiederum mit den Ergebnissen der Deriphat-Gelelektrophorese korreliert (Abb. 3.51/3.52).

Für G101R und G109R wurde mehr Degradationsprodukt beobachtet, als nach der mittleren Lebenszeit zu erwarten war, was auf die Einführung einer zusätzlichen Trypsin-Schnittstelle durch den Aminosäureaustausch zurückzuführen sein könnte. Für Q122H und Q122L wurde dagegen deutlich weniger 14-15 kDa-Produkt beobachtet als erwartet. Möglicherweise erhöht ein Aminosäureaustausch in Position 122 zwar die Zugänglichkeit der luminalen Schleife, reduziert aber auch die Stabilität des C-terminalen Fragmentes, was die Ergebnisse des Trypsinverdaus verfälschen würde.

4 Diskussion

4.1 Mutationsanalyse der luminalen Schleife

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ergebnisse einer Mutationsanalyse (durchgeführt von K. Eggert unter Anleitung von B. Heinemann) neu ausgewertet (Kap. 3.4.1 und 3.4.2). Durch die Induktion zufälliger Aminosäureaustausche in der luminalen Schleife inklusive angrenzender helicaler Bereichen des LHCIIB und anschließende Selektion von Mutanten, die keine stabilen Pigment-Protein-Komplexe bildeten, konnten Aminosäuren identifiziert werden, deren Austausch zu einer Destabilisierung des Pigment-Protein-Komplexes führt. Generelle Aussagen über die Art der strukturell bedeutenden Interaktionen ließen sich aus der Verteilung der destabilisierenden Einzelaminosäureaustausche bezüglich des chemischen Charakters der ausgetauschten Aminosäuren ableiten.

Das Selektionsverfahren, das zur Identifizierung destabilisierter Mutanten führte, unterschied nicht zwischen einer mangelnden Rekonstitutionsfähigkeit und einer tatsächlichen Destabilisierung der Komplexe. In weiteren Untersuchungen unter weniger stringenten Bedingungen (Kap. 3.4.3) zeigte sich, dass alle identifizierten Lhcb1-Mutanten mit einzelnen Aminosäureaustauschen in der Lage waren, Pigment-Protein-Komplexe zu bilden, dass die Austausche jedoch in unterschiedlichem Maße zu einer Destabilisierung der Komplexe führten.

Der Vergleich der destabilisierenden Wirkung verschiedener Aminosäureaustausche wurde herangezogen, um ein differenzierteres Bild über strukturell bedeutende Interaktionen einzelner Aminosäuren der luminalen Schleifendomäne zu erhalten.

4.1.1 Destabilisierende Einzelaminosäureaustausche

4.1.1.1 Lokalisation destabilisierender Einzelaminosäureaustausche

Destabilisierende Einzelaminosäureaustausche, die im Rahmen der Mutationsanalyse (Kap. 3.4) identifiziert werden konnten, zeigten keine offensichtlichen Hot-Spot-Regionen, sondern waren nahezu gleichmäßig über den gesamten Zielbereich der Mutationsanalyse verteilt (Abb. 3.46, Kap. 3.4.2). Dabei konnte für zwei aus den fünf Resten von Helix 1 (40 %) und für etwa 30 % der Reste in der Schleifendomäne ein destabilisierender Austausch beobachtet werden, was die frühere Beobachtung (Heinemann et al., 1999) unterstützt, dass die Schleifendomänen im LHCIIB etwa genauso empfindlich gegenüber destabilisierenden Einzelaminosäureaustauschen sind wie die Transmembranhelices. In der Elektronenkristallographischen Analyse der LHCIIB-Struktur (Kühlbrandt et al., 1994) konnte der Abschnitt zwischen Aminosäure A100 und P116 nicht aufgelöst werden, was auf eine höhere Mobilität bzw. eine weniger definierte Struktur dieses Bereiches hindeuten könnte. Die beschriebene Mutationsanalyse lieferten allerdings keinen Hinweis auf eine geringere Sensitivität dieses Bereiches gegenüber destabilisierenden Austauschen, was den Schluss zulässt, dass dieser Bereich ebenso zur LHCIIB-Stabilität beiträgt wie die restliche Schleifendomäne.

In einer Studie von Zhou et al., 2000, zeigte sich, dass die Übergangsbereiche zwischen Transmembranhelix und Schleifenregion besonders sensitive Ziele bei der Steigerung der Stabilität der Diacylglycerol Kinase sind, einem integralen Membranprotein aus *Escherichia coli*. Entsprechend könnte vermutet werden, dass diese Bereiche sich auch durch eine besondere Sensitivität gegenüber destabilisierenden Aminosäureaustauschen auszeichnen. In der vorliegenden Mutationsanalyse konnte für zwei der vier Aminosäuren, die die Grenzen der beiden Transmembranhelices definieren, destabilisierende Aminosäureaustausche

beobachtet werden (Abb. 3.46, Kap. 3.4.2). Für die jeweils benachbarten Aminosäuren wurden dagegen keine destabilisierenden Aminosäureaustausche identifiziert. Entsprechend erschien die Sensitivität dieser Bereiche nicht höher als die des restlichen Zielbereiches.

Innerhalb der Familie der Chlorophyll *a/b*-bindenden Proteine ist im Bereich der luminalen Schleife lediglich das W₉₇FXAG₁₀₁-Motiv konserviert (Green et al., 1994). Dieses Motiv könnte an der Bindung eines Pigment-Clusters, bestehend aus Chl *a*₆, Chl *a*₇ und einer Lutein-Kopfgruppe, beteiligt sein (Green et al., 1995). In der vorliegenden Studie konnten destabilisierende Austausche an den Positionen W97 und G101 identifiziert werden. Für F98 und A100 wurden dagegen keine destabilisierenden Einzelaminosäureaustausche beobachtet, F98 wurde allerdings in insgesamt drei multiplen Mutanten ausgetauscht. Falls das WFXAG-Motiv von besonderer Bedeutung für die Pigmentbindung und für die Stabilisierung des Pigment-Protein-Komplexes sein sollte, dann scheint der Rest der Schleifendomäne von ebenso großer Wichtigkeit zu sein.

4.1.1.2 Einschränkungen der Mutationsanalyse

Bei der Interpretation der Ergebnisse der Mutationsanalyse muss berücksichtigt werden, dass nicht jede Aminosäure durch jede beliebige andere Aminosäure ersetzt werden konnte. Die Mutationsrate von ca. 1 % ließ lediglich den Austausch eines Nukleotids pro Codon zu. Bedingt durch den degenerierten genetischen Code, führten lediglich 5 bis 8 (durchschnittlich 6) der 9 möglichen Austausche zur Codierung einer anderen Aminosäure. Unterschiede in der Wahrscheinlichkeit eines Aminosäureaustausches spiegelten sich allerdings nicht offensichtlich in den Ergebnissen der Mutationsanalyse wider. So erwies sich z.B. Glycin, das durch vier verschiedene Basentriplets codiert wird, als sehr sensitiv gegenüber destabilisierenden Aminosäureaustauschen. Die ungleiche Verteilung der Nukleotid-Austausche (Tab. 3.14, Kap. 3.4.) führte zu weiteren Einschränkungen der Wahrscheinlichkeit bestimmter Aminosäureaustausche. Die Nukleotide G und C wurden weniger häufig ausgetauscht als A und T. Für Codons, die ausschließlich aus G und C bestehen, ist die Wahrscheinlichkeit eines Aminosäureaustausches daher um Faktor 4 geringer als für A/T-Codons. Auch diese Einschränkung ist in den Ergebnissen der Mutationsanalyse nicht zu erkennen, da auch für G114, das durch ein reines G/C-Basentriplet codiert wird, ein destabilisierender Aminosäureaustausch beobachtet werden konnte.

Wegen der überraschend hohen Anzahl an destabilisierenden Einzelaminosäureaustauschen konnte das ursprüngliche Ziel, eine Sättigung der Mutationsanalyse, nicht erreicht werden, obwohl bereits wesentlich mehr Mutanten analysiert wurden, als in Heinemann et al., 1999. Eine Sättigung wäre erreicht, wenn alle Einzelaminosäureaustausche in mehr als einem unabhängigen Experiment beobachtet worden wären. In der vorliegenden Studie konnten lediglich 4 aus 13 Einzelaminosäureaustauschen mehrfach beobachtet werden. Entsprechend müssen die 30 % der sensitiven Aminosäuren als unterer Schätzwert betrachtet werden, und es ist anzunehmen, dass weitere Experimente zur Identifizierung weiterer sensitiver Aminosäuren im Zielbereich führen würden.

4.1.1.3 Destabilisierung durch Änderung der chemischen Eigenschaften einer Aminosäureposition

Wie erwähnt, zeigte sich keine Häufung destabilisierender Austausche in bestimmten Bereichen der luminalen Schleife. In Bezug auf die chemischen Eigenschaften der ausgetauschten Aminosäuren war die Verteilung jedoch keinesfalls zufällig. Bis auf eine hydrophobe, wurden nur polare bzw. saure Aminosäuren und Glycine ausgetauscht (Tab. 3.16, Kap. 3.4.2).

Für alle 3 sauren Aminosäuren im Zielbereich der Mutationsanalyse wurden destabilisierende Austausche beobachtet, weshalb saure Aminosäuren als besonders sensitive Ziele angesehen werden können. Alle sauren Aminosäuren wurden durch kleine apolare Reste ersetzt (G, V), obwohl in jedem Fall eine Substitution durch eine andere saure Aminosäure durch zwei verschiedene Nukleotidaustausche möglich gewesen wäre. Es kann zwar nicht ausgeschlossen werden, dass der destabilisierende Effekt dieser Mutationen in Zusammenhang mit der Änderung der Größe oder der Polarität zu sehen ist, allerdings spricht die beobachtete Häufung der Austausche saurer im Vergleich zu basischen Aminosäuren (3 von 3 gegenüber 0 von 3) dafür, dass der Verlust der negativen Ladung die Stabilität der Pigment-Protein-Komplexe einschränkt. Ein Verlust positiver Ladungen scheint nach den Ergebnissen der Mutationsanalyse weniger dramatisch für die Komplexstabilität zu sein. Dagegen beinhaltete ein destabilisierender Austausch überdurchschnittlich häufig die Insertion einer zusätzlichen positiven Ladung; lediglich in einem Fall konnte ein destabilisierender Austausch eines Glycins gegen eine saure Aminosäure beobachtet werden.

Falls tatsächlich ein Zusammenhang zwischen einer Erhöhung der positiven Nettoladung der luminalen Schleifendomäne und der Destabilisierung des LHCIIb bestehen sollte, könnte dem eine regulative Bedeutung zukommen. Durch starke Energetisierung der Thylakoide, sinkt der pH-Wert des Lumens auf Werte um 5. Der niedrige pH-Wert des Lumens führt zur Aktivierung der Violaxanthin Deepoxidase, die die Bildung des Zeaxanthins im Rahmen des Xanthophyll-Zyklus katalysiert. Dadurch kommt es zum Abbau überschüssiger Anregungsenergie im Lichtsammelsystem und eine photooxidative Schädigung wird vermieden (Horton et al., 1994; Horton et al., 1996; Niyogi et al., 1999; Müller et al., 2001; Morosinotto et al., 2003). Unabhängig davon, ob die Deepoxidase Zugang zu LHCIIb-gebundenem Violaxanthin erhält, oder das Pigment den Komplex verlassen muss, um deepoxidiert zu werden (Jahns et al., 2001; Morosinotto et al., 2002), erfordert die Konvertierung des Violaxanthins eine relativ offene Struktur des Pigment-Protein-Komplexes an seiner luminalen Oberfläche, die durch eine Änderung des pH-Wertes induziert werden könnte. Tatsächlich konnten bei unterschiedlichen pH-Werten unterschiedliche Xanthophyll-Austauschraten beobachtet werden (Morosinotto et al., 2002). Bei niedrigem luminalen pH in stark energetisierten Thylakoiden sollte zumindest ein Teil der D- und E-Seitenketten in der luminalen Schleifendomäne des LHCIIb protoniert werden und damit die negative Ladung verlieren. Diese Protonierung könnte zu einer Ablösung der luminalen Schleifendomäne vom Rest des LHCIIb führen, falls die sauren Reste bei neutralem pH Salzbrücken mit basischen Resten bilden. Nach der LHCIIb Kristallstruktur erscheint eine Interaktion zwischen E94 und K203, in der Schleifendomäne zwischen Helix 3 und der vierten amphiphilen Helix, möglich. Eine strukturell bedeutende Vernetzung zweier Schleifendomänen über eine Salzbrücke wurde für Bakteriorhodopsin vorgeschlagen, wobei durch diese Vernetzung die korrekte Positionierung der benachbarten Transmembranhelices gewährleistet werden soll (Allen et al., 2001). Die Position von E107 und D111 in der LHCIIb-Kristallstruktur konnte nicht bestimmt werden (Kühlbrandt et al., 1994), allerdings ist unabhängig von ihrer exakten Position K91, in der luminalen Schleifendomäne, die nächstgelegene basische Aminosäure. K91 wurde in drei multiplen Mutanten ausgetauscht, ein destabilisierender Einzelaminosäureaustausch dieser Aminosäure wurde jedoch nicht beobachtet, was zwar auf eine Beteiligung dieser Aminosäure an der Stabilisierung des Pigment-Protein-Komplexes hinweisen könnte, diese aber nicht beweist. Neben Salzbrücken könnten saure Aminosäuren auch an elektrostatischen Interaktionen mit polaren Aminosäuren beteiligt sein, wobei diese Interaktionen ebenfalls pH-reguliert sein könnten und der Verlust negative Auswirkungen auf die Stabilität der Pigment-Protein-Komplexe haben könnte.

Die These, dass Mutationen, die zur Steigerung der positiven Nettoladung der luminalen Schleifendomäne führen und in diesem Sinne den Effekt eines niedrigen luminalen pH-

Wertes stark energetisierter Thylakoide nachahmen, der sich in einer destabilisierenden Konformationsänderung der luminalen Schleifendomäne äußert, könnte durch die konservativeren Austausche D/N und E/Q überprüft werden. Falls die These zutrifft, und tatsächlich der Verlust der negativen Nettoladung für die Destabilisierung verantwortlich ist, sollten diese konservativen Austausche den gleichen Effekt haben.

Hydrophobe Aminosäuren, die etwa 40 % des Zielbereiches ausmachen, wurden in der vorliegenden Mutationsanalyse auffällig selten ausgetauscht. Lediglich in Position W97 konnte ein destabilisierender Einzelaminosäureaustausch beobachtet werden (Tab. 3.16, Kap. 3.4.2). In der vorangehenden Studie (Heinemann et al., 1999) wurden zwei destabilisierende Austausche hydrophober Aminosäuren in der stromalen Schleifendomäne beobachtet, ein Austausch von L durch P und ein Austausch von P durch L. In beiden Fällen blieb die Hydrophobizität nahezu unverändert, es war aber P involviert, eine Aminosäure, die bekanntermaßen Knicke des Polypeptid-Rückgrats verursacht und dadurch prädestiniert dazu ist, die Struktur eines Proteinbereiches zu verändern. Der relativ seltene Austausch hydrophober Aminosäuren legte den Schluss nahe, dass der Beitrag einzelner hydrophober Aminosäuren in LHCIIB-Schleifendomänen vergleichsweise gering ist.

Die einzige hydrophobe Aminosäure, für die in der vorliegenden Mutationsanalyse ein destabilisierender Austausch beobachtet werden konnte, W97, wurde in 3 unabhängigen Experimenten ausgetauscht, was aus seine besondere Bedeutung für die Stabilität des LHCIIB hindeuten könnte. W97, Teil des WFXAG-Motivs, ist in den meisten Chl *a/b*-bindenden Proteinen konserviert (Green et al., 1994). In Membranproteinen scheinen Tryptophane die hydratisierte Übergangsphase zwischen der Lipid-Doppelschicht und der wässrigen Umgebung dem hydrophoben Inneren der Membran vorzuziehen (Yau et al., 1998). Im Falle des photosynthetischen Reaktionszentrums in Purpurbakterien berichteten Schiffer et al., 1992, dass Tryptophan-Reste entfernte Bereiche des Proteins vernetzen können. Strukturelle Daten (Kühlbrandt et al., 1994) weisen auf eine ähnliche Funktion von W97 in LHCIIB hin, da die luminal Schleifendomäne genau an dieser Position in die Membran eintaucht. W97 kommt dadurch in die Nähe von F195, am distalen Ende von Helix 3 (Abb. 4.1).

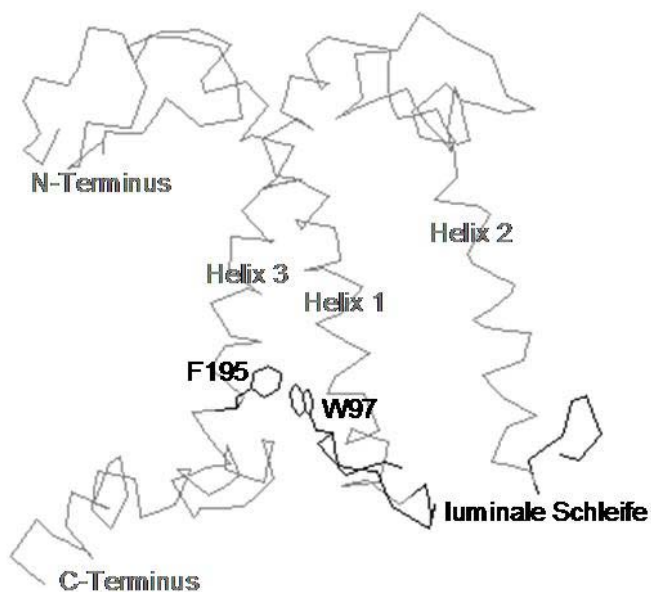


Abb. 4.1: Interaktion von W97 und F195. Dargestellt ist die 3D-Struktur des Peptid-Rückgrates des LHCIIB (nach strukturellen Daten von W. Kühlbrandt, persönliche Mitteilung). Das Segment zwischen A100 und P116 wurde in der Kristallstruktur nicht aufgelöst und fehlt daher in der Darstellung. Die Seitenketten von W97 und F195, sowie die sichtbaren Abschnitte der luminalen Schleifendomäne sind durch die schwarze Färbung hervorgehoben. Die 3D-Struktur wurde mithilfe des Programmes DeepView/Swiss Pdb Viewer v3.7 (www.expasy.org/spdbv) dargestellt.

Der Abstand zwischen den Zentren der aromatischen Ringe konnte nicht genau bestimmt werden, liegt aber mit hoher Wahrscheinlichkeit in einem Bereich zwischen 4-6 Å, der die aromatische Interaktion zwischen den beiden Resten erlaubt (Burley et al., 1986). Die relative

Orientierung der aromatischen Ringe, wobei die planaren Ebenen nahezu senkrecht zueinander orientiert sind, begünstigt bekanntermaßen die aromatische Interaktion (Burley et al., 1986). Diese Interaktion verbindet möglicherweise die luminale Schleife mit Helix 3 und könnte für die Stabilität des LHCIIB von essentieller Bedeutung sein. F195 ist genau wie W97 in den meisten Chl *a/b*-bindenden-Proteinen konserviert (Green et al., 1994) und wurde in der vorhergehenden Studie in drei multiplen Mutanten ausgetauscht (Heinemann et al., 1999). Interessanterweise war es ebenfalls ein Tryptophan, dessen Verlust in fortschreitenden Exodeletionen am C-terminalen Ende des Proteins zu einer Destabilisierung des Komplexes führte (Paulsen et al., 1992). Austausch dieses W222 gegen H oder G beeinträchtigten zwar nicht die Pigment-bindenden Eigenschaften des Komplexes, verhinderten aber die Trimerisierung, wohingegen der Austausch durch F eine Trimerisierung weiterhin erlaubte.

In der vorliegenden Mutationsanalyse wurde W97 in allen drei Fällen durch R ersetzt. Wie oben erwähnt, könnte die Insertion einer zusätzlichen positiven Ladung zur Destabilisierung des Komplexes geführt haben. Um die strukturelle Bedeutung der Aminosäure W97 zu bestätigen, wären Austausche durch ungeladene Aminosäuren nötig.

Für etwa die Hälfte der polaren Aminosäuren konnten destabilisierende Austausche beobachtet werden, was sie im Vergleich zu hydrophoben Aminosäuren zu deutlich sensitiveren Zielen macht. Bevorzugte Austausche von polaren Resten mit bestimmten funktionalen Gruppen wie Hydroxyl- oder Amid-Gruppen konnte nicht beobachtet werden. Ein Beispiel für die Empfindlichkeit polarer Reste gegenüber destabilisierenden Austauschen ist der konservative Austausch S102T, der lediglich eine Änderung der Position der Hydroxylgruppe beinhaltete. Diese Änderung reichte offensichtlich aus, um den Pigment-Protein-Komplex zu destabilisieren.

Glycin-Reste erwiesen sich in der vorliegenden Mutationsanalyse ebenfalls als sensitive Ziele. Für vier der sechs Glycine in der Zieldomäne wurde ein destabilisierender Austausch beobachtet (Tab. 3.16, Kap. 3.4.2). Glycin-Reste sind im Allgemeinen weder an polaren noch hydrophoben Wechselwirkungen beteiligt, sondern erhöhen aufgrund ihrer geringen Größe die lokale Flexibilität einer Aminosäurekette. Zwei der Glycine wurden durch positiv geladene Aminosäuren ausgetauscht, was in diesen Fällen zur Destabilisierung des LHCIIB geführt haben könnte.

4.1.2 Vergleichende Stabilitätsuntersuchungen

Die Ergebnisse der Mutationsanalyse zeigten, dass in allen Bereichen der Zieldomäne eine ähnliche Sensitivität gegenüber destabilisierenden Aminosäureaustauschen herrschte, dass allerdings eine starke Häufung der Austausche polarer, insbesondere saurer Aminosäuren vorlag. Vergleichende Stabilitätsuntersuchungen unter weniger stringenten Bedingungen sollten klären, ob verschiedene Austausche den Pigment-Protein-Komplex in unterschiedlichem Maße destabilisieren.

Dabei wurden verschiedene Methoden zur Beurteilung der Stabilität angewandt, die überraschenderweise zum Teil zu unterschiedlichen Ergebnissen führten (Kap. 3.4.3). Es zeigte sich, dass sowohl die Ausbeuten an Pigment-Protein-Komplexen nach einer schwach denaturierenden LDS- als auch nach einer Deriphat-Gelelektrophorese durch die Mutationen beeinflusst wurden, dass jedoch keine Korrelation zwischen den Ergebnissen der beiden Gelsysteme bestand. Die Ergebnisse der Deriphat-Gelelektrophorese schienen dagegen in Zusammenhang mit den mittleren Lebenszeiten bei 37°C und mit der Trypsinsensitivität der luminalen Schleifendomäne zu stehen.

Offensichtlich treten unter verschiedenen Bedingungen unterschiedliche Aspekte der Stabilisierung in den Vordergrund, die durch die Aminosäureaustausche in unterschiedlichem Maße beeinflusst werden. Entsprechend kann nicht von „der Stabilität“ eines Pigment-

Protein-Komplexes gesprochen werden, vielmehr muss, wie unten dargelegt, die thermische Stabilität und die Stabilität gegenüber SDS differenziert betrachtet werden.

4.1.2.1 Destabilisierung durch SDS/LDS

Alle Mutanten zeigten im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduzierte Ausbeuten an Pigment-Protein-Komplexen, wenn die Komplexe durch Detergenswechsel rekonstituiert und in einer schwach denaturierenden LDS-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden. Diese Ergebnisse bestätigen die in Kap. 3.4.2 beschriebene Instabilität der Mutanten unter diesen Bedingungen. Insgesamt konnte die Ausbeute an Pigment-Proteinkomplexen durch 10 mM DTT und 0,4 µg/µl Xanthophyll im Rekonstitutionsansatz erhöht werden (vgl. Kap. 3.2.3.1.1), weshalb für einige Mutanten im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen (Kap. 3.4.2) noch grüne Pigment-Protein-Komplexbanden zu erkennen waren.

Überraschend waren jedoch die vergleichsweise hohen Ausbeuten an Pigment-Protein-Komplexen nach einer schwach denaturierenden Gelelektrophorese mit Deriphat-Laufpuffer. Für alle Mutanten, bis auf W97R, konnten unter diesen Bedingungen Pigment-Protein-Komplexe isoliert werden, wobei sich die Ausbeuten zum Teil nur unwesentlich von der des Wildtyps unterschieden (Abb. 3.49, Kap. 3.4.3.1). Ein Vergleich der Ausbeuten nach einer Gelelektrophorese mit Deriphat- und LDS-Puffer (Abb. 3.50, Kap. 3.4.3.1) zeigte, dass die Mutanten empfindlicher auf die Verwendung des LDS-Puffers reagierten als der Wildtyp. Lediglich S102T zeigte bei Verwendung des LDS-Laufpuffers keinen stärkeren Rückgang der Ausbeute als der Wildtyp, insgesamt lagen die relativen Komplexbandenintensitäten dieser Mutante jedoch unter denen des Wildtyps.

Eine Rekonstitution durch Frier-Tau-Zyklen, die in Anwesenheit von 2 % LDS durchgeführt wurde, reduzierte die Ausbeuten an Pigment-Protein-Komplexen in gleichem Maße wie die Verwendung des LDS-Laufpuffers während der schwach denaturierenden Gelelektrophorese, was auf eine generelle SDS/LDS-Sensitivität hindeutet. Die Beispiele N183D und G184S, Mutanten mit Austausch in der dritten Transmembranhelix, zeigten (Abb. 3.31, Kap. 3.2.3.1.2), dass dies nicht immer der Fall war. Bei diesen beiden Mutanten führte lediglich die Rekonstitution durch Frier-Tau-Zyklen zu reduzierten Ausbeuten, während nach einer schwach denaturierenden LDS-Gelelektrophorese keine Reduzierung der Pigment-Protein-Komplexbanden im Vergleich zu einer Deriphat-Gelelektrophorese festgestellt werden konnten. Es erscheint daher möglich, dass eine generelle SDS/LDS-Sensitivität insbesondere durch Austausch in der luminalen Schleifendomäne verursacht wird, was allerdings durch die Untersuchung weiterer Mutanten mit Einzelaminosäureaustauschen in anderen Domänen des LHCIb bestätigt werden müsste.

Eine Denaturierung durch SDS führt im Allgemeinen nicht zu einer Auflösung der α -Helices (Reynolds et al., 1970) und am Beispiel der Diacylglycerolkinase aus *Escherichia coli* konnte gezeigt werden (Lau et al., 1997), dass die Struktur der Transmembrandomänen im Gegensatz zu extramembranen Bereichen sehr stabil gegenüber einer Denaturierung durch SDS ist. Lau et al., 1997 beobachteten einen SDS-abhängigen zwei-stufigen Entfaltungsprozess, wobei es zunächst zu Änderungen der Extramembran-Domänen kommt, denen die Auflösung der Tertiärstruktur des Proteins im Inneren der Membran folgt. Die Transmembranhelices blieben dabei vermutlich erhalten. Ein Einfluss der extramembranen Schleifendomänen in Bezug auf die Stabilität eines Membranproteins gegenüber SDS zeigte sich auch in einer Studie an Bakteriorhodopsin, in der die Schleifendomänen einzeln durch unstrukturierte Verbindungsstücke aus Glycin- und Serin-Resten ersetzt wurden (Kim et al., 2001). Alle diese Mutanten konnten zwar funktionales Bakteriorhodopsin bilden, zeigten aber eine erhöhte Sensitivität gegenüber SDS. Entsprechend könnte die beobachtete SDS-Sensitivität der Mutanten auf eine spezielle Funktion der luminalen Schleifendomäne während der Stabilisierung des Komplexes gegenüber SDS hindeuten. Um zu klären, ob die SDS-

Sensitivität ein generelles Merkmal von Lhcb1-Mutanten mit Änderungen in den Schleifendomänen ist, wäre eine Untersuchung der Mutanten mit Austausch in der stromalen Schleife hinsichtlich dieser Eigenschaft notwendig.

4.1.2.2 Thermodynamische Destabilisierung

Die Ergebnisse der schwach denaturierenden Deriphat-Gelelektrophorese zeigten keine Korrelation mit den Ergebnissen bei Verwendung des LDS-Laufpuffers (Abb. 3.50, Kap. 3.4.3.1), ließen sich jedoch mit den mittleren Lebenszeiten des Energietransfers bei 37°C in Zusammenhang bringen (Abb. 3.51 und 3.52, Kap. 3.4.3.2). Die mittleren Lebenszeiten wurden während einer Erwärmung auf 37°C ermittelt, und reflektieren daher die thermische Stabilität der Mutanten.

Eine thermodynamische Destabilisierung ist in erster Linie durch eine gesteigerte intermolekulare Bewegungsfreiheit begründet, die zum Übergang des energetisch stabilen nativen Zustandes in einen denaturierten Zustand führt. Thermodynamische Entfaltungen eines Proteins können mit der lokal begrenzten Entfaltung bestimmter Bereiche des Proteins beginnen (Gilbert et al., 1982; Vriend et al., 1998; Hori et al., 2000; Van den Burg et al., 2002), wobei lokal begrenzte Entfaltungen die selektive Zugänglichkeit einzelner Trypsinschnittstellen zur Folge haben können (Gilbert et al., 1982) und eine notwendige Voraussetzung für die limitierte Proteolyse sind (Hubbard et al., 1994).

Die luminalen Schleifendomäne enthält zwei potentielle Trypsinschnittstellen, die im rekonstituierten Protein vor einer tryptischen Spaltung geschützt sind (K91 und K99). Wie der Trypsinverdau rekonstituierter Komplexe zeigte, ist zumindest eine dieser Schnittstellen in den Mutanten in unterschiedlichem Maße zugänglich, was zum transienten Auftreten verschiedener Mengen des C-terminalen Fragmentes einer Länge von 14-15 kDa führte (Abb. 3.53, Kap. 3.4.3.3). Bei proteolytischer Spaltung des intakten Komplexes in der luminalen Schleife sollte neben dem C-terminalen Fragment ein kürzeres N-terminales Fragment auftreten, das allerdings nicht beobachtet werden konnte. Eine Trypsin-Resistenz des C-terminalen Fragmentes ist ohne die Gegenwart der ersten Transmembranhelix unwahrscheinlich, da die Tertiärstruktur des LHCIIB vor allem durch Interaktionen zwischen der ersten und dritten Transmembranhelix (Kühlbrandt et al., 1994) bzw. durch ein Cluster bestehend aus den Pigmenten Chl a_1 , b_1 , Lut_1 und einem Polypeptidabschnitt in der stromalen Hälfte der ersten Transmembranhelix (Formaggio et al., 2001) definiert ist. Ein Verlust der ersten Transmembranhelix sollte daher den unmittelbaren Zerfall des Pigment-Protein-Komplexes und den vollständigen Abbau des Lhcb1-Proteins durch Trypsin zur Folge haben. Es ist nicht auszuschließen, dass das verwendete polyklonale Antiserum bevorzugt Epitope im C-terminalen Fragment erkennt. Das Kontrollprotein 39a.2, das den N-Terminus des Lhcb1 bis einschließlich der ersten Transmembranhelix enthält, schien deutlich schwächer mit dem Antikörper zu reagieren als das unverdaute Lhcb1 (Abb. 3.56, Kap. 3.4.3.3), wobei ein Vergleich problematisch ist, da in keinem Fall gleiche Mengen des 39a.2 und der unverdauten Lhcb1-Kontrolle aufgetragen wurden. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass die Beständigkeit eines kurzen Abschnittes der ersten Transmembranhelix ausreichend ist, um das C-terminale Fragment zu stabilisieren. Verkürzungen des N-terminalen Fragmentes durch weitere tryptische Spaltungen könnten dazu geführt haben, dass dieses in den beschriebenen Experimenten (Kap.3.4.3.3) nicht nachweisbar war.

Die prinzipielle Korrelation der Trypsinsensitivität der luminalen Schleife und der mittleren Lebenszeit bei 37°C (Abb. 3.56, Kap. 3.4.3.3) könnten einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der lokalen Entfaltung der luminalen Schleifendomäne und der thermischen Destabilisierung andeuten. Wie für Ribonuklease A (Gilbert et al., 1982) und 3-Isopropylmalat Dehydrogenase (Hori et al., 2000) beobachtet, könnte die lokale Entfaltung der luminalen Schleifendomäne die thermische Denaturierung des LHCIIB einleiten.

Genau wie während einer Denaturierung durch SDS (Lau et al., 1997), führt die thermische Destabilisierung von Membranproteinen nur zu einem geringen Rückgang des α -helicalen Anteils. Dieser ist vermutlich auf die Auflösung von α -Helices, die parallel zur Membran orientiert sind, und auf die Entfaltung der hydrophilen Enden von Transmembranhelices zurückzuführen, während der Großteil der Transmembranhelices bestehen bleibt (Haltia, et al., 1995). Die Transmembranbereiche zeichnen sich generell durch eine hohe Stabilität aus, möglicherweise bleiben während einer thermischen Denaturierung von α -helicalen Membranproteinen nicht nur die transmembranen α -Helices bestehen, sondern auch einzelne interhelicale Wechselwirkungen (Haltia et al., 1995).

Das Vorliegen eines partiell entfalteten Zustandes des LHCIIB bei 37°C, der zwar keinen Energietransfer mehr zeigt, in dem aber die Polypeptidkette zumindest teilweise vor einer proteolytischen Degradation geschützt ist, wird durch die Ergebnisse des Trypsinverdaus rekonstituierter Komplexe bei 37°C in der vorliegenden Arbeit (3.41, Kap. 3.2.3.3) bestätigt.

4.1.2.3 Destabilisierende Effekte einzelner Aminosäuren

Falls die Hitze- oder SDS-induzierte Denaturierung von Membranproteinen als mehr oder weniger vollständige Umkehrung des zweiten Schrittes der Faltung von Membranproteinen, der Zusammenlagerung der Transmembranhelices (Popot et al., 1990 und 2000), zu betrachten ist, kann geschlossen werden, dass die Schleifendomänen von Membranproteinen an der Assemblierung der Transmembranhelices beteiligt sind. Tatsächlich zeigten Untersuchungen an Bakteriorhodopsin, dass der Faltungsprozess durch die Länge der Schleifendomänen beeinflusst werden kann (Teufel et al., 1993). Inwieweit die Faltung des LHCIIB dem allgemein geforderten zweistufigen Prozess der Membranproteinfaltung (Popot et al., 1990 und 2000) entspricht, ist allerdings noch unklar, da eine vollständige Ausbildung der α -Helices nicht ohne die Anwesenheit der Pigmente erfolgt (Horn et al., 2002) und keine Hinweise für die Existenz eines Faltungsintermediates, bestehend aus Transmembranhelices und Pigmenten vorliegen (Horn, pers. Mitteilung). Unabhängig vom genauen Ablauf des Faltungsprozesses kann jedoch auch im Falle des LHCIIB davon ausgegangen werden, dass Interaktionen zwischen Transmembranhelices entscheidend zur Stabilität des Pigment-Protein-Komplexes beitragen. Eine Beteiligung der Schleifendomänen an der Stabilisierung durch Beeinflussung der Helix-Packung, wäre daher genau wie für Bakteriorhodopsin denkbar.

Im Gegensatz zu einer Bedeutung der Schleifendomänen als Verbindungsstücke spezifischer Länge, impliziert die Sensitivität des Zielbereiches für destabilisierende Einzelaminosäureaustausche allerdings spezifische Interaktionen einzelner Aminosäuren oder eine durch diese Aminosäure beeinflusste stabilisierende Struktur der Schleifendomäne. Wie für die Oberflächen löslicher Proteine beschrieben (Van den Burg et al., 2002), könnten komplexe Netzwerke aus elektrostatischen Wechselwirkungen die Struktur der luminalen Schleifendomäne definieren, die wiederum ausschlaggebend für die Packung der Transmembranhelices sein könnte.

Wie erwähnt, schien für einzelne Mutanten jedoch kein Zusammenhang zwischen der thermischen Instabilität und der SDS-Sensitivität zu bestehen. Die SDS-Sensitivität zeigte eine Abhängigkeit von der Art des Austausches, während die thermische Stabilität einen Einfluss der Lokalisation der Mutation zeigte. Mutanten, in denen saure Aminosäuren oder Glycin-Reste ausgetauscht waren, zeigten, bis auf G101R, eine sehr ähnliche SDS-Sensitivität. Dabei schien die Destabilisierung lediglich auf den Verlust einer bestimmten Aminosäure zurückzuführen zu sein, ein Einfluss der induzierten Aminosäure war nicht zu beobachten. Das ähnliche Verhalten von Mutanten, in denen saure Aminosäuren bzw. Glycin-Reste ausgetauscht wurden, deutet auf einen ähnlichen Effekt der Mutationen hin. Eine Funktion saurer Aminosäuren könnte die Bildung von Salzbrücken sein, während eine

gemeinsame Funktion der Glycin-Reste vermutlich in der minimalen Einschränkung der Bewegungsfreiheit des Polypeptidrückgrates zu sehen ist und andere Aminosäuren an diesen Positionen durch sterische Hinderungen Konformationsänderungen des Polypeptidrückgrates verursachen. Der ähnliche Effekt eines Verlustes von Glycin- bzw sauren Resten spricht gegen die Beteiligung saurer Aminosäuren an strukturell bedeutenden Salzbrücken. Wahrscheinlicher ist eine allgemeine Störung eines oben erwähnten komplexen Netzwerkes aus elektrostatischen Interaktionen, das zum einen von der Ladungsverteilung abhängig ist und zum anderen die definierte räumliche Anordnung der interagierenden Gruppen und damit eine bestimmte Konformation des Polypeptidrückgrates erfordert.

Die thermische Instabilität war in den meisten Fällen geringer als die SDS-Sensitivität, und Mutanten mit ähnlichen Aminosäureaustauschen zeigten nicht unbedingt eine ähnliche thermische Stabilität. Z.B. führte der Austausch der Glutamate in Position E94 und E107 zu einer stärkeren Verkürzung der mittleren Lebenszeit als der Austausch des Aspartats in Position 111 (Abb. 3.52, Kap. 3.4.3.2). Der konservative Austausch S102T erhöhte die SDS-Sensitivität genauso wie der Austausch N115Y, führte jedoch zu einer deutlich geringeren Stabilität während der thermischen Denaturierung. Am Beispiel der Mutanten, in denen Glycine ausgetauscht wurden, wird die Tendenz deutlich, dass gleichartige Mutationen eine stärkere thermische Denaturierung verursachen, je geringer ihr Abstand zu W97 ist (Abb. 3.52, Kap. 3.4.3.2).

Die Bedeutung des Tryptophans in Position 97, die schon aufgrund der herausragenden Sensitivität dieser Position während der Mutationsanalyse vermutet wurde (Kap. 4.1.1.3), bestätigte sich in den Stabilitätsuntersuchungen. Die Austauschmutante W97R zeigte unter allen Bedingungen die geringste Stabilität. Falls die in Kap. 4.1.1.3 postulierte aromatische Interaktion zwischen W97 und F195 tatsächlich bestehen und von ausschlaggebender Bedeutung für die Stabilität des LHCIIb sein sollte, könnte die Destabilisierung durch verschiedene Aminosäureaustausche auch eine indirekte Ursache haben, indem diese Interaktion durch Konformationsänderungen der luminalen Schleife geschwächt wird. Die Bindungsstärke aromatischer Interaktionen ist in hohem Maße von Abstand und Orientierung der beteiligten aromatischen Reste abhängig (Burley et al., 1986; Hunter et al., 1991). Schon kleinste Änderungen der Konformation des Peptid-Rückgrates in der unmittelbaren Nachbarschaft von W97 könnten daher zu einer Schwächung der aromatischen Interaktion und damit zu einer reduzierten thermischen Stabilität führen.

Die zentrale Bedeutung einer einzelnen relativ schwachen und sensitiven Wechselwirkung für die thermische Stabilität des LHCIIb lässt sich eigentlich nur durch eine physiologische Notwendigkeit begründen. Wie schon erwähnt, könnten pH-abhängige Konformationsänderungen der luminalen Schleife die Xanthophyll-Austauschraten von Lhc-Proteinen und damit den Ablauf des Xanthophyll-Zyklus beeinflussen (Morosinotto et al., 2002). Die Funktion der aromatischen Wechselwirkung zwischen W97 und F195 könnte die eines sensitiven Schalters sein, mit dessen Hilfe eine lokale Entfaltung der luminalen Schleife erreicht werden kann, ohne die Struktur des gesamten Komplexes zu verändern. Die lokale Entfaltung der luminalen Schleife führt zwar zu einer Destabilisierung des Komplexes, durch die Bindung des Zeaxanthins könnten diese Prozesse jedoch unterbunden werden. Unterbleibt die rettende Zeaxanthin-Bindung aufgrund einer Überlastung des Schutzsystems, könnte die gezielte Exposition einzelner Protease-Schnittstellen durch die lokale Entfaltung der luminalen Schleifendomäne die kontrollierte Degradation des LHCIIb einleitet. Eine Langzeit-Anpassung an stärkere Belichtung schließt die proteolytische Degradation der äußeren PSII-Antennenproteine ein, wobei neben einer licht-abhängigen Induktion der Protease-Expression, die Beteiligung eines Regulationsmechanismus auf Substratebene gezeigt werden konnte (Yang et al., 1998). Ein beobachtetes 16 kDa-Abbauprodukt (Lindahl

et al., 1995) entspricht möglicherweise dem C-terminalen Fragment nach einer proteolytischen Spaltung in der luminalen Schleifendomäne.

Falls diese Hypothese zutrifft, sollte die lokale Entfaltung der luminalen Schleifendomäne durch die Anwesenheit von Zeaxanthin reduziert werden. Einige der vorliegenden Mutanten, die eine starke Entfaltung der luminalen Schleifendomäne zeigen, könnten verwendet werden, um den stabilisierenden Effekt von Zeaxanthin nachzuweisen.

Aus den unterschiedlichen Stabilitäten gegenüber einer Hitze- bzw. einer SDS-Denaturierung kann geschlossen werden, dass jeweils andere Prozesse die Entfaltung der Proteine limitieren. Wie oben erwähnt, ist prinzipiell davon auszugehen, dass es in beiden Fällen zu einer Denaturierung extramembraner Domänen kommt, während die Transmembranhelices erhalten bleiben (Lau et al., 1997; Haltia et al., 1995). Generell zeigten die Mutanten im Vergleich zu ihrer SDS-Sensitivität eine überraschend hohe thermische Stabilität, wobei die lokale Entfaltung der luminalen Schleife den limitierenden Faktor der thermischen Denaturierung darstellte. Wie das Beispiel der Mutanten mit Austausch in den Positionen 120/122 am deutlichsten zeigte, war die SDS-Sensitivität jedoch nicht mit der Tendenz der luminalen Schleifendomäne zur lokalen Entfaltung korreliert. Die relative Position der Aminosäureaustausche zu W97, die die thermische Stabilität beeinflusste, schien keinen Effekt auf die SDS-Sensitivität der Mutanten zu haben. Die Schwächung der aromatischen Interaktion zwischen W97 und F195 durch eine Konformationsänderung des Polypeptidrückgrates äußert sich möglicherweise lediglich in einer Hitzesensitivität, während diese Wechselwirkung durch SDS weniger strapaziert wird. Dagegen könnte eine Konformationsänderung des Polypeptidrückgrates zu einer mangelnden Abschirmung des hydrophoben Komplexinneren gegenüber SDS führen, was die SDS-Sensitivität der Mutanten erklären würde.

4.1.3 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der Mutationsanalyse lassen den Schluss zu, dass das Polypeptidrückgrat der luminalen Schleifendomäne eine spezifische Konformation einnimmt und dass diese Konformation die Stabilität des LHCIIB gegenüber thermischer Denaturierung und gegenüber Dissoziation durch SDS beeinflusst. Die Konformation der luminalen Schleife ist vermutlich durch ein komplexes Netzwerk elektrostatischer Wechselwirkungen definiert, was die vergleichsweise hohe Sensitivität polarer und saurer Aminosäuren gegenüber destabilisierenden Austauschen erklärt.

Die vergleichenden Stabilitätsuntersuchungen zeigten, dass im Falle der SDS-Sensitivität vor allem die chemische Natur der ausgetauschten Aminosäure über den destabilisierenden Effekt der Mutation entscheidet, während der Effekt einer Mutation auf die thermische Stabilität des Pigment-Protein-Komplexes in erster Linie von der Lokalisation des Austausches, bzw. von seiner Entfernung zu W97 abhängig ist.

Die thermische Stabilität des Pigment-Protein-Komplexes scheint daher in erster Linie auf der aromatischen Wechselwirkung zwischen W97 und F195 zu beruhen, während die Stabilität gegenüber SDS durch mehrere elektrostatische Wechselwirkungen gewährleistet werden könnte.

Während einer thermischen Denaturierung der LHCIIB-Mutanten stellte offensichtlich die lokale Entfaltung der luminalen Schleifendomäne den zeitbegrenzenden Faktor dar, für die Sensitivität gegenüber SDS spielte die gesteigerte Beweglichkeit der Schleifendomäne dagegen keine Rolle.

Die luminalen Schleife könnte einer thermischen Denaturierung insbesondere dadurch entgegenwirken, dass sie, wie eine Klammer, den Zusammenhalt der drei

Transmembranhelices gewährleistet. Ihre stabilisierende Funktion gegenüber einer Denaturierung durch SDS könnte dagegen darin bestehen, das hydrophobe Komplexinnere vor dem denaturierenden Agens abzuschirmen.

4.2 Selektion stabiler Lhcb1b-Mutanten durch die proteolytische Degradation entfalteter Proteine

In der vorliegenden Arbeit wurde ein System beschrieben und getestet, das die *In vitro*-Selektion von Lhcb1-Mutanten ermöglichen sollte, die besonders stabile Pigment-Protein-Komplexe bilden. Dabei wurde die Tatsache genutzt, dass Lhcb1-Protein, das in Pigment-Protein-Komplexen vorliegt, vor einer proteolytischen Degradation geschützt ist (Paulsen et al., 1993). Falls der proteolytische Verdau unter Bedingungen durchgeführt wird, unter denen ausschließlich stabile Mutanten als Pigment-Protein-Komplexe vorliegen, bleiben lediglich diese Lhcb1-Proteine bestehen und werden während der nachfolgenden Immobilisierung durch Anti-Lhcb1-Antikörper gebunden. Um eine parallele Selektion auf Protein- und DNA-Ebene zu ermöglichen, wurden die Lhcb1-Proteine als Phage-Display exprimiert.

Durch Anreicherungsexperimente, wie in Sparks et al., 1996 beschrieben, wurden theoretische Anreicherungsfaktoren für stabile, instabile und Lhcb1-Wildtyp-Bakteriophagen bestimmt. Falls eine stabile Mutante durch die Rekonstitution vollständig vor der proteolytischen Degradation geschützt ist, sollte sie sich pro Selektionsrunde um Faktor 4,5-6 anreichern (3.1.2.4.3).

Ausgehend von Zufallsmutanten-Bibliotheken wurden fünf Selektionsrunden durchgeführt, was den Anreicherungsfaktor stabiler Mutanten auf $4,5^5$ - 6^5 steigern sollte. Die Ergebnisse erschienen aussichtsreicher, wenn der Trypsinverdau bei 37°C und nicht bei Raumtemperatur in Gegenwart von 0,2 % SDS durchgeführt, und die Stringenz der Immobilisierung durch erhöhte NaCl-Konzentration gesteigert wurde (Kap. 3.2.2.1).

Nach jedem Selektionsexperiment wurde eine Auswahl isolierter Mutanten überexprimiert und hinsichtlich ihrer funktionalen Stabilität mit unmutiertem Lhcb1-Protein verglichen.

4.2.1 Anreicherung von Lhcb1-Proteinen mit Wildtyp-Stabilität

Nach fünf Selektionsrunden war der Großteil der untersuchten Mutanten zur Bildung stabiler Pigment-Protein-Komplexe in der Lage, keine der isolierten Mutanten zeichnete sich aber, wie erhofft, durch einen höheren Energietransfer bzw. besonders stabile Pigment-Protein-Komplexe während einer schwach denaturierenden Gelelektrophorese mit Deriphat-Laufpuffer aus. Die Sequenzierung mehrerer Mutanten zeigte, dass hauptsächlich die Aminosäuresequenz des Lhcb1-Wildtyps vertreten war. Lediglich zwei Aminosäureaustausche wurden beobachtet, die allerdings beide mehrfach auftraten.

Falls keine Mutante in der Ausgangsmischung vorhanden war, die eine signifikant höhere Stabilität aufwies als der Wildtyp, wäre dieses Ergebnis der Selektionsexperimente zu erwarten. Anstatt der Anreicherung stabiler Mutanten gegenüber Lhcb1-Wildtyp wäre mit einer Abreicherung instabiler Mutanten zu rechnen. Nach Trypsinverdau bei 37°C und Immobilisierung bei 0,5 M NaCl wurde lediglich eine Mutante isoliert, die keine Pigment-Protein-Komplexe bildete (Mutante 15, Selektionsexperiment 2). Diese Mutante exprimiert ein verkürztes Lhcb1-Protein, was, wie in Kap. 3.2.1 geschildert, zu einem Selektionsvorteil während der Amplifikationsschritte geführt haben könnte.

4.2.1.1 Gehäuftes Auftreten der Lhcb1-Wildtyp-Sequenz

Aufgrund der geringen Mutationsrate (Kap. 3.3.1.1) und einem gewissen Hintergrund an religiertem Vektor (Kap. 3.2.1) war zu erwarten, dass die Ausgangsbibliothek einen großen Anteil an unmutiertem Lhcb1 enthält. Die folgenden Berechnungen sollen klären, ob das

gehäufte Auftreten der Wildtyp-Sequenz lediglich die Häufigkeit in der Ausgangsbibliothek widerspiegelt, oder ob von einer Anreicherung zu sprechen ist. Der Anteil der Wildtyp-Proteine ist abhängig von der Anzahl der Mutageneserunden und von der Religationsrate. Die Berechnungen werden exemplarisch für Selektionsexperiment 3 durchgeführt, da in diesem Fall die größte Anzahl an Mutanten sequenziert wurde.

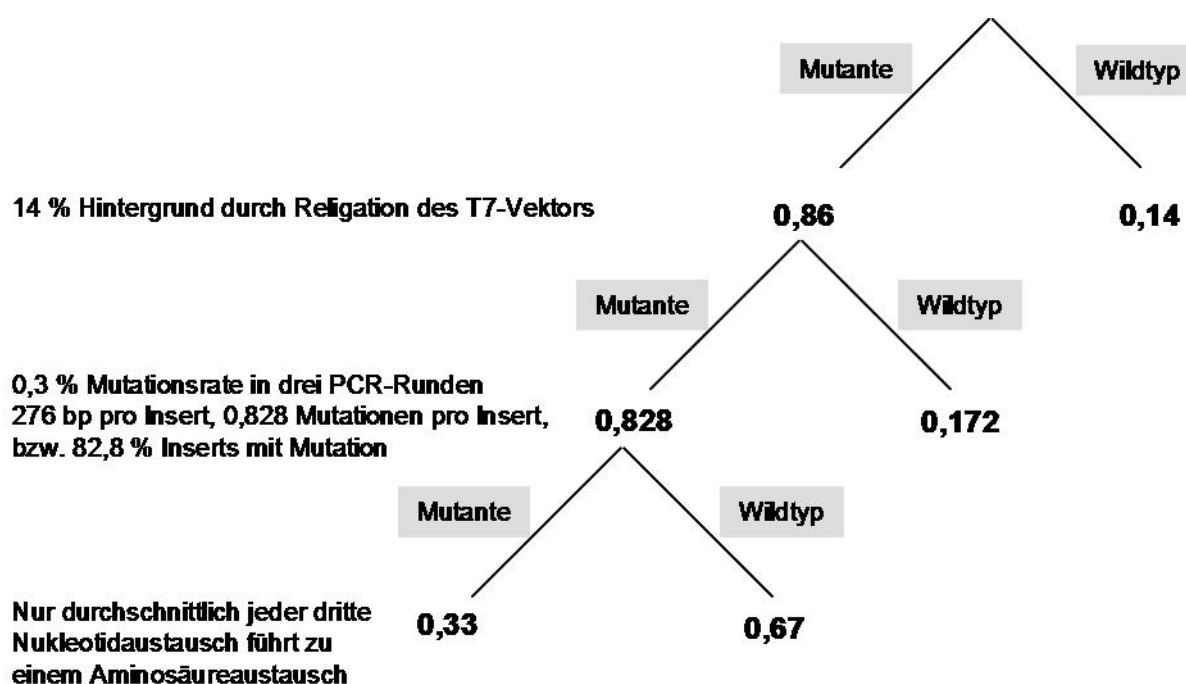


Abb. 4.2: Wahrscheinlichkeit für einen Aminosäureaustausch.

Die Berechnung wurde für Selektionsexperiment 3 durchgeführt. Bestimmung der Religationsrate: Kap. 3.2.1. Bestimmung der Mutageneserate: Kap. 3.3.1.1.

Der Anteil an religiertem Phagenvektor lag für Selektionsexperiment 3 bei etwa 14 % der erhaltenen Mutanten (Kap. 3.2.1). Bei einer Mutationsrate von 0,1 % pro PCR-Runde (Kap. 3.3.1.1) bzw. 0,3 % in drei PCR-Runden sollten etwa 0,828 Nukleotidaustausche pro Amplifikat vorliegen, d.h., bei 82,8 % der Mutanten ist ein Nukleotidaustausch zu erwarten. Wegen des degenerierten genetischen Codes führt allerdings durchschnittlich nur jeder dritte Nukleotidaustausch auch zur Codierung einer anderen Aminosäure. Insgesamt kann daher davon ausgegangen werden, dass nur etwa 23,5 % der Bakteriophagen die genetische Information für ein Lhcb1-Protein mit einem Aminosäureaustausch enthielten, die Wahrscheinlichkeit für einen Nukleotidaustausch lag bei 71,2 %. In sieben sequenzierten Mutanten ohne auffälligen Einfluss einer evtl. Mutation wären 1-2 Aminosäureaustausche und ca. 5 Nukleotidaustausche zu erwarten gewesen. Es konnten jedoch lediglich zwei stille Mutationen beobachtet werden, was den Schluss nahe legt, dass es zu einer Anreicherung der Lhcb1-Wildtyp-Sequenz kam.

Die Anreicherung der Wildtyp-Sequenz lässt den Schluss zu, dass keine bzw. nicht ausreichend signifikant stabilere Mutanten in der Phagenbibliothek vorlagen. Eine weitere Berechnung soll daher klären, wie viele stabilisierende Mutationen mindestens erforderlich gewesen wären, um nach fünf Selektionsrunden die gleiche Anzahl stabiler Mutanten wie Wildtyp vorzufinden.

Die Anreicherungsrate des unmutierten Lhcb1 gegenüber stabilen Mutanten nach einem Trypsinverdau bei 37°C wurde nicht bestimmt. Die Ergebnisse des Trypsinverdaus des freien Proteins unter Selektionsbedingungen (Kap. 3.2.3.3, Abb. 3.40) lassen allerdings den Schluss zu, dass ein Verdau bei 37°C zu einer stärkeren Degradation des Lhcb1-Wildtyps und damit zu einer geringeren Anreicherungsrate gegenüber stabilen Mutanten führt. Bei vollständigem Abbau des Lhcb1-Proteins unter Selektionsbedingungen, wäre eine Anreicherung von stabilen Mutanten gegenüber Wildtyp-Proteinen um Faktor 1800-7800 möglich. Zu Beginn des Selektionsexperimentes hätte daher mindestens eine stabile Mutante pro 1800 unmutierten Proteinen bzw. Mutanten mit Wildtyp-Stabilität vorliegen müssen. Bei einer Gesamtanzahl von $8,4 \times 10^4$ Bakteriophagen wären daher 47 stabile Mutanten ausreichend gewesen, um nach fünf Selektionsrunden 50 % stabile Mutanten im Eluat vorzufinden. Da, wie oben berechnet, lediglich in 23,5 % der Bakteriophagen ein Aminosäureaustausch vorlag, enthielt die Ausgangsbibliothek vermutlich 19740 Mutanten. Entsprechend hätten 0,24 % aller Aminosäureaustausche einen stabilisierenden Effekt haben müssen, um 50 % stabile Mutanten im Eluat der fünften Selektionsrunde zu erhalten.

4.2.1.2 Gehäuftes Auftreten der Mutanten E207G und N183D

Zwar enthielten die Eluate nach fünf Selektionsrunden einen großen Anteil an unmutierten Lhcb1-Phagen, die einzigen Aminosäureaustausche, die beobachtet wurden, E207G und N183D, traten allerdings mehrfach auf. Dabei wurde E207G in unabhängigen Selektionsexperimenten isoliert, während im Falle von N183D eine Duplikation während der Transformation nicht auszuschließen ist. Falls diese Mutanten nicht bereits in der Ausgangsbibliothek in großer Anzahl vertreten waren, muss das mehrfache Auftreten dieser Mutationen auf eine Anreicherung zurückzuführen sein.

Tatsächlich erscheint die Anreicherung einzelner Mutanten möglich (Kap. 4.2.1.2.1) und Stabilitätsuntersuchungen sollten klären, ob der Selektionsvorteil dieser Mutanten in einer Stabilitätsverbesserung der Pigment-Protein-Komplexe besteht.

4.2.1.2.1 Anreicherung einzelner Mutanten

Wie in Kap. 3.1.2.4 gezeigt, konnte nur ein sehr geringer Anteil der Lhcb1-Bakteriophagen, die in die Immobilisierung eingesetzt wurden, bei einer anschließenden Elution wieder zurück gewonnen werden. Zusätzlich kam es zu größeren Verlusten während der Reinigungsschritte. Um diese Verluste auszugleichen, wurden eluierte Bakteriophagen vor Beginn der nächsten Selektionsrunde amplifiziert. Die folgenden Berechnungen sollen klären, inwieweit die Amplifikationsschritte die Verluste an Bakteriophagenmaterial ausgleichen konnten, und ob eine Vermehrung einzelner Mutanten während der Selektionsrunden möglich war.

Insgesamt enthielten die verwendeten Bakteriophagenbibliotheken durchschnittlich $1,2 \times 10^5$ pfu. Die Bakteriophagen wurden amplifiziert und ca. $2,5 \times 10^{10}$ wurden in ein Selektionsexperiment eingesetzt, d.h. jede Mutante sollte zu Beginn der Selektion in ca. 2×10^5 -facher Kopie vorhanden sein. Während der Reinigungsschritte nach Rekonstitution und Trypsinverdau kam es zu Verlusten von bis zu Faktor 100. Entsprechend reduzierte sich die Anzahl der Kopien einer Mutante, die in die Immobilisierung eingesetzt wurden, auf 2×10^3 . Die Wiedergewinnungsrate von T7 GlySer-Bakteriophagen in einer unverdauten Kontrolle kann zur Abschätzung des Verlustes stabiler Mutanten während der Immobilisierung herangezogen werden. Dabei muss der Wert in Tab. 3.6 (Kap. 3.1.2.4.3) durch Faktor 3 geteilt werden, da die Eluate Trypsin-verdauter Proben generell einen um etwa Faktor 3 geringeren Phagentiter aufwiesen. Damit kann für stabile Mutanten eine Wiedergewinnungsrate von etwa 0,005 % angenommen werden. Entsprechend kann nicht davon ausgegangen werden, dass zumindest eine Kopie jeder stabilen Mutante nach der ersten Selektionsrunde im Amplifikat vorhanden ist. Vielmehr ist damit zu rechnen, dass nur 10 % der stabilen Mutanten die zweite

Selektionsrunde erreichen. Für instabile Mutanten wurde in Kap. 3.1.2.4.3 eine Wiedergewinnungsrate von ca. 0,001 % bestimmt, lediglich 2 % der instabilen Mutanten konnten daher die zweite Selektionsrunde erreichen.

Bei dieser Berechnung ist zu beachten, dass die Wiedergewinnungsraten in Kap. 3.1.2.4.3 nach einer Elution mit 1 % SDS bestimmt wurden. Während der Selektionsexperimente wurden immobilisierte Bakteriophagen allerdings durch eine *in situ*-Amplifikation eluiert. Falls die niedrigen Wiedergewinnungsraten zumindest teilweise auf eine unvollständige Elution durch 1 % SDS zurückzuführen sind, wären für eine Elution durch *in situ*-Amplifikation höhere Wiedergewinnungsraten zu erwarten.

Entsprechend der obigen Berechnungen ist damit zu rechnen, dass sich die Anzahl der verschiedenen Mutanten nach der ersten Selektionsrunde mindestens um Faktor 10 reduziert hat. Vor Beginn der nächsten Selektionsrunde wurden die Bakteriophagen jedoch wieder auf die ursprüngliche Menge amplifiziert. Von jeder einzelnen stabilen Mutante sollten daher zu Beginn der zweiten Selektionsrunde mindestens 2×10^4 Kopien vorliegen. Ein weiterer Verlust stabiler Mutanten sollte daher in der zweiten Selektionsrunde nicht eintreten, für instabile Mutanten ist allerdings mit einem Verlust von 80 % zu rechnen. Da sich nur noch Verluste von instabilen bzw. Wildtyp-Lhcb1-Bakteriophagen ereignen sollten, ist tendenziell mit einer weiteren Erhöhung der Kopienanzahl stabiler Mutanten nach der Amplifizierung zu rechnen. Entsprechend sollte es zu weiteren Steigerungen der Kopienanzahl stabiler Mutanten kommen und die Vermehrung einzelner Mutanten erscheint möglich.

Dennoch ist die Isolierung der Mutanten E207G in unabhängigen Experimenten erstaunlich, da, wie oben berechnet, nur eine Chance von 1 : 10 besteht, dass nach der ersten Selektionsrunde eine bestimmte Mutante in zwei unabhängigen Experimenten im Eluat vorhanden ist. Allerdings ist dabei zu beachten, dass die Phagen-Verluste während der Reinigungsschritte schwankten. Die obigen Berechnungen wurden mit dem maximalen Verlust von Faktor 100 durchgeführt und entsprechen unter Umständen nicht in jedem Fall der Realität.

4.2.1.2.2 Mögliche Selektionsvorteile der Mutanten E207G und N183D

Nach einer Rekonstitution durch SDS-Verdünnung zeigte keine der beiden Mutanten im Vergleich zur unmutierten Kontrolle eine Stabilitätsverbesserung (Kap. 3.2.2.1 und 3.2.2.3). Der Aminosäureaustausch N183D führte dagegen zu reduzierten Energietransferraten und weniger Pigment-Protein-Komplexen nach einer schwach denaturierenden Gelelektrophorese. Um auszuschließen, dass eine verbesserte Stabilität nur unter bestimmten Bedingungen zu erkennen sein könnte, wurden weitere Stabilitätsvergleiche angestellt (Kap. 3.2.3), wobei im wesentlichen die Methoden zum Einsatz kamen, die zur Charakterisierung der Mutanten mit destabilisierenden Austauschen in der luminalen Schleifendomäne herangezogen worden waren (Kap. 3.4).

E207G

Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen in Kap. 3.2.3 ergaben keinen Hinweis auf eine signifikante Verbesserung der Stabilität des Pigment-Protein-Komplexes durch Austausch des Glutamates in Position 207. Tendenziell zeigte E207G eher eine geringfügig schlechtere Stabilität als die unmutierte Kontrolle, sowohl der Anteil der Pigment-Protein-Komplexbande nach einer schwach denaturierenden Gelelektrophorese als auch die mittlere Lebenszeit in Gegenwart von 4 M Guanidinium-Hydrochlorid (pH 7,8) lagen unter den Werten, die für die unmutierte Kontrolle ermittelt wurden. Die mittlere Lebenszeit bei 37°C wurde bei verschiedenen pH-Werten bestimmt, wobei auch bei einem pH-Wert von 9, wie während des

Trypsinverdau, kein stabilisierender Effekt des Austausches E207G zu erkennen war. Ein möglicher destabilisierender Einfluss des Glutamatrestes in Position E207 ist demnach unabhängig von seiner Ladung.

E207 ist in der vierten, amphiphilen Helix auf der luminalen Seite des LHCIIb lokalisiert. Dabei ist diese hydrophile Seitenkette dem wässrigen Milieu außerhalb der Lipid-Doppelschicht zugewandt. Ein Austausch dieser stark polaren Aminosäure gegen ein Glycin könnte zu einer Orientierungsänderung der vierten amphiphilen Helix führen, wobei das N-proximale Ende dieser Helix möglicherweise tiefer in die Membran eintaucht, als im unmutierten Komplex. Falls der Aminosäureaustausch diese Konformationsänderung zur Folge haben sollte, ist nach den durchgeführten Untersuchungen allerdings lediglich von einem marginalen Effekt auf die Stabilität des Pigment-Protein-Komplexes auszugehen.

Die Energiemessung nach einer Detergenswechselrekonstitution, die, wie in Selektionsexperiment 1, ohne DTT durchgeführt wurde, zeigte einen etwas höheren Energietransfer der Mutante E207G im Vergleich zur Ausgangsmutante. Auch das Ergebnis des Trypsinverdau bei 37°C (Abb. 3.41, Kap. 3.2.3.3) könnte eine leichte Stabilitätsverbesserung der Mutante E207G unter diesen Bedingungen andeuten. Generell waren die Ausbeuten an Pigment-Protein-Komplexen nach einer Rekonstitution ohne DTT schlechter als mit DTT, wie sich sowohl in einer Messung des Energietransfers (Abb. 3.36, Kap. 3.2.3.2.1) als auch nach einem Trypsinverdau zeigte (Abb. 3.41, Kap. 3.2.3.3). Eine Bestimmung der mittleren Lebenszeiten der Pigment-Protein-Komplexe mit und ohne DTT war aufgrund des geringen Energietransfers nicht möglich, es konnte daher nicht unterschieden werden, ob die Anwesenheit von DTT lediglich die Rekonstitutionsausbeute steigert, oder auch die Stabilität der Pigment-Protein-Komplexe erhöht. Zur Überexpression wurden die mutierten Abschnitte in den Vektor C3.2h ligiert, der, im Gegensatz zu T7 GlySerSphI, ein Cystein in Position 79 enthält. Möglicherweise reduzieren intermolekulare Disulfidbrücken die Rekonstitutionsausbeute der freien Proteine und spiegeln damit nicht die Situation während der Selektionsexperimente wider. Um zu überprüfen, ob der Aminosäureaustausch E207G die Stabilität des Pigment-Protein-Komplexes in Abwesenheit von DTT erhöht, wären Versuche mit E207G-Mutanten ohne Cystein notwendig.

Eine eventuelle Steigerung der Stabilität der Pigment-Protein-Komplexe in Gegenwart des Reduktionsmittels DTT spricht dafür, dass oxidative Prozesse den Komplexzerfall begünstigen. Photooxidative Prozesse führen bekanntermaßen zur Degradation der Pigmente (Siefertmann-Harms et al., 1998) bzw. des Lhcb-Proteins (Zolla et al., 2002), sowohl die Rekonstitution als auch der Trypsinverdau wurden allerdings bei stark reduzierter Belichtung durchgeführt. Falls dennoch photooxidative Prozesse den Zerfall der Komplexe maßgeblich beeinflussen, könnte eine erhöhte Stabilität der E207G-Pigment-Protein-Komplexe in Abwesenheit von DTT auf eine verbesserte Abschirmung der Pigmente vor O₂, wie in Siefertmann-Harms et al., 1998 postuliert, hinweisen.

N183D

Wie oben erwähnt, führte der Aminosäureaustausch N183D nach einer Rekonstitution durch SDS-Verdünnung zu deutlich reduzierten Energietransferraten und zu einem verminderten Anteil an Pigment-Protein-Komplexbanden. In weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass der Energietransfer auch nach einer Detergenswechselrekonstitution reduziert war. Nach einem Trypsinverdau konnte jedoch die gleiche Menge an Degradationsprodukt beobachtet werden, wie für unmutiertes Lhcb1-Protein und E207G. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass diese Mutante Pigment-Protein-Komplexe bildet, die im Vergleich zum Wildtyp veränderte Fluoreszenz-Eigenschaften zeigen. Während der thermischen Denaturierung war zwar ein Anstieg der Chl *b*-Fluoreszenz zu beobachten, die Chl *a*-Fluoreszenz blieb dagegen

auf dem gleichen Niveau wie zu Beginn der Messung (Abb. 3.2.3.2.1). Es war daher nicht möglich, den Zerfall der Pigment-Protein-Komplexe dieser Mutante anhand des Rückganges des Energietransfers zu verfolgen. Für Aussagen über die Stabilität müssen daher die Ergebnisse der schwach denaturierenden Gelelektrophorese herangezogen werden (Kap. 3.2.3.1.2).

Im Falle dieser Mutanten zeigte sich eine starke Abhängigkeit der Ausbeute an Pigment-Protein-Komplexen von der angewandten Rekonstitutionsmethode. Rekonstitution durch Frier-Tau-Zyklen führte zu signifikant reduzierten Ausbeuten, durch eine Detergenswechsel-Rekonstitution konnten dagegen Ausbeuten erreicht werden, die mit denen des Wildtyps vergleichbar waren (Abb. 3.30, Kap. 3.2.3.1.2). Im Gegensatz zu den Mutanten mit destabilisierenden Aminosäureaustauschen in der luminalen Schleifendomäne (Kap. 3.4.3.1) war im Falle von N183D jedoch keine generelle SDS-Sensitivität zu beobachten, da die Verwendung von LDS-Laufpuffer zu höheren Ausbeuten führte als die Verwendung von Deriphat-Laufpuffer (Abb. 3.30, Kap. 3.2.3.1.2). Ein sehr ähnliches Verhalten, wenn auch generell geringere Ausbeuten, wurde für G184S beobachtet (Abb. 3.31, Kap. 3.2.3.1.2), was auf einen ähnlichen Effekt beider Austausche hinweist. Der Energietransfer der Mutante G184S war allerdings nicht reduziert und die mittlere Lebenszeit lag sogar höher als die des Wildtyps (Heinemann, 2000). Nach Detergenswechsel-Rekonstitution und LDS-Gelelektrophorese konnten für N183D relative Komplexbandenintensitäten bestimmt werden, die höher lagen als die des Wildtyps (Abb. 3.30, Kap. 3.2.3.1.2). Vermutlich ist daher weniger die Stabilität der Pigment-Protein-Komplexe reduziert als vielmehr die Ausbeute an Komplexen nach einer Rekonstitution durch Frier-Tau-Zyklen.

Die Positionen 183/184 befinden sich am proximalen Ende der dritten Transmembranhelix. Beide Aminosäuren sind in Chl *a/b*-bindenden und Fucoxanthin-Chl *c*-bindenden Proteinen konserviert (Green et al., 1995). Der Abschnitt von G184 bis M191 der dritten Helix steht in engem Kontakt mit S69 bis A76 der ersten Helix (Kühlbrandt et al., 1994), wobei G184 auf der Kontaktseite zwischen beiden Helices lokalisiert ist (W. Kühlbrandt, Sturkturdaten, pers. Mitteilung). Ein Austausch in dieser Position könnte daher Interaktionen zwischen den beiden Transmembranhelices behindern. Der Austausch G184D wurde in Heinemann et al., 1999 als destabilisierend identifiziert, ein weiterer destabilisierender Austausch, F189L, befand sich ebenfalls innerhalb des Kontaktbereiches zwischen Helix 1 und 3. Speziell der Aminosäure Glycin wird große Bedeutung im Zusammenhang mit Helix-Helix-Interaktionen in Membranproteinen beigemessen (Javadpour et al., 1999), wobei der Austausch des Glycins durch jede andere Aminosäure zu einer sterischen Hinderung führen kann. Die vorliegenden Daten weisen allerdings daraufhin, dass diese Helix-Helix-Interaktionen vornehmlich während der Rekonstitution durch Frier-Tau-Zyklen von Bedeutung sind, und die Stabilität der Komplexe weniger beeinflussen.

Auch der Aminosäureaustausch N183D schien die Stabilität der Pigment-Protein-Komplexe zwar weder positiv noch negativ zu beeinflussen, wie oben erwähnt, zeigten Mutanten mit diesem Aminosäureaustausch jedoch deutlich andere Fluoreszenz-Eigenschaften als Lhcb1-Wildtyp. Bei N183 handelt es sich um eine Chl *a*-Bindestelle, wobei dieses Chl *a* als einer der finalen Emittter der Anregungsenergie des LHCIIB diskutiert wird (Rogl et al., 1999; Remelli et al., 1999; Rogl et al., 2002). Nach Austausch von N183 gegen Leucin wurde der Verlust von Chl *a*₂ und *b*₂ (Nummerierung nach Kühlbrandt et al., 1994) beschrieben (Formaggio et al., 2001), wohingegen für die Mutante N183A lediglich von einem Chl *a*-Verlust berichtet wurde (Hobe et al., 2003). Die Energietransferrate der Austauschmutante N183L war im Vergleich zum Wildtyp um etwa 30 % reduziert (Formaggio et al., 2001). Die Komplexe zeigten dagegen während einer Temperaturerhöhung ähnliche Stabilitäten wie der Wildtyp und die Photoresistenz der mutanten Komplexe lag sogar höher (Formaggio et al., 2001). Chl *a*₂ ist nicht in Nachbarschaft eines Polylen-Ringes lokalisiert und trägt daher evtl. nicht zum

Quenching der Triplett-Anregungszustände von Chlorophyllen bei (Formaggio et al., 2001). Falls es sich bei Chl a_2 tatsächlich um die bevorzugte Austrittsstelle der Anregungsenergie handelt, könnte das Fehlen dieses Chlorophyllmoleküls eine Verlängerung der Anregungszustände der verbleibenden Chl a -Moleküle zur Folge haben, die dadurch vermehrt in den Triplet-Zustand übergehen könnten, der wiederum durch die Carotenoide gequenchet wird. Entsprechend wäre zwar ein Energietransfer von Chl b auf Chl a vorhanden, wie beobachtet (Abb. 3.33, Kap. 3.2.3.2.1) würde sich ein Rückgang des Energietransfers jedoch nur in einem Anstieg der Chl b -Fluoreszenz äußern. Allerdings wurde der Verlust eines oder mehrerer Chl-Moleküle durch die Mutation N183D nicht überprüft. Nach Hobe et al., 2003 wäre durch den Austausch der schwachen Lewis-Base Asparagin durch die stärkere Lewis-Base Aspartat sogar eine Erhöhung der Chl a -Affinität dieser Bindungsstelle zu erwarten.

Unabhängig davon, ob die Mutation N183D zu einem Pigment-Verlust führt, oder ob die Fluoreszenz-spektroskopischen Eigenschaften dieser Mutante durch eine veränderte Konformation bedingt sind, ergaben die Stabilitätsuntersuchungen, dass die Stabilität dieser Pigment-Protein-Komplexe unter Selektionsbedingungen mit der des Wildtyps vergleichbar ist. Der erste Eindruck, es könnte sich um eine destabilisierte Mutante handeln, bestätigte sich damit nicht. Die relativen Komplexbandenanteile nach Detergenswechsel-Rekonstitution und schwach denaturierender LDS-Gelelektrophorese könnten dagegen eine geringfügig verbesserte Stabilität im Vergleich zu Wildtyp-Lhcb1 andeuten (Abb. 3.30, Kap. 3.2.3.1.2).

Weder E207G- noch N183D-Pigment-Protein-Komplexe zeigten im Rahmen der Untersuchungen eine signifikant erhöhte Stabilität. Es ergaben sich lediglich Hinweise auf geringfügige Stabilitätsverbesserungen, wobei unklar ist, ob diese den Anreicherungsfaktor gegenüber Lhcb1-Wildtyp in ausreichendem Maße steigern, um zu dem beobachteten gehäuftem Auftreten zu führen. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass im Falle dieser Mutanten ein Selektionsvorteil vorlag, der unabhängig von der Stabilität der Pigment-Protein-Komplexe war. Z.B. könnten speziell bei einer Expression als Phage-Display bestimmte Aminosäuren durch Interaktion mit der Phagenoberfläche eine Rekonstitution erschweren. Anreicherungsversuche von T7 E207G und T7 N183D könnten Aufschluss darüber geben, ob diese Aminosäureaustausche zu einem Selektionsvorteil der Lhcb1-Bakteriophagen führen.

4.2.2 Methodische Einschränkungen

Unabhängig davon, ob die Stabilität der Mutanten E207G und N183D evtl. geringfügig besser ist, als die des Wildtyps, entsprach das Ergebnis der durchgeführten Selektionen nicht den Erwartungen. Es konnte keine Mutante mit einer signifikant verbesserten Stabilität isoliert werden, obwohl, wie in Kap. 4.2.1.1 berechnet, ein Anteil von 0,24 % stabilisierender Einzelaminosäureaustausche nicht unrealistisch erscheint. Lau et al., 1999 berichteten von stabilisierenden Einzelaminosäureaustauschen in der Diacylglycerolkinase aus *Escherichia coli* und auch für LHCIIB wurden drei Aminosäureaustausche beschrieben, die zumindest die mittlere Lebenszeit des Energietransfers bei 37°C erhöhen (Heinemann, 2000).

Im Folgenden sollen einige Punkte besprochen werden, die zu einer eingeschränkten Eignung der angewandten Selektionsmethode geführt haben könnten.

4.2.2.1 Anreicherungsfaktoren

Die geringen Anreicherungsfaktoren führten zum einen dazu, dass eine Anreicherung stabiler Mutanten gegenüber T7-WT lediglich bei Vorliegen einer ausreichenden Anzahl stabilisierender Mutationen möglich war (Kap. 4.2.1.1), zum anderen verursachte die geringe Wiederfindungsrate den Verlust von ca. 90 % aller stabiler Mutanten zu Beginn der Selektion (Kap. 4.2.1.2.1). Entsprechend wären, um 50 % stabile Mutanten nach fünf Selektionsrunden zu erhalten, 2,4 % stabilisierende Einzelaminosäureaustausche notwendig gewesen.

Im Falle der T7 Lhcb1-Bakteriophagen gelang lediglich eine Anreicherung um Faktor 5-7 gegenüber T7 WT-Phagen (Kap. 3.1.2.4.3), wobei die Wechselwirkung zwischen Antigen- und Antikörper eine deutlich effizientere Anreicherung erlauben sollten. Generell sollten sich bindende gegenüber nicht-bindenden Bakteriophagen während einer Biopanning-Runde um Faktor 10^3 anreichern (Sparks et al., 1996). Tatsächlich gelang in einem Experiment eine Anreicherung von T7-Lhcb1-Phagen gegenüber T7 WT-Phagen um Faktor 2×10^2 (Tab. 3.2, Kap. 3.1.2.4.2.2). In diesem Fall wurden die Lysate unmittelbar nach der Lyse durch Zentrifugation geklärt, anschließend mit 0,01 % SDS versetzt und auf die mit Antikörper beschichtete Protein G-Platte aufgetragen. Durch die Zugabe des Solubilisierungspuffers (Kap. 3.1.2.4.2.3) reduzierte sich der Anreicherungsfaktor für eine Kontrolle ohne Pigment um etwa Faktor 10 auf 18, in der Gegenwart von Pigment konnte sogar lediglich ein Anreicherungsfaktor von 6 beobachtet werden (Tab. 3.3, Kap. 3.1.2.4.2.3). Die Reinigung der Proben durch zweifache Pelletierung in einem Glyzeringradienten (Tab. 3.4, Kap. 3.1.2.4.3) führte nicht zu einer Steigerung der Anreicherungsfaktoren. Da Sparks et al., 1996 von Wiederfindungsraten im Bereich von 1 % sprechen, unter Selektionsbedingungen für T7 Lhcb1-Phagen jedoch lediglich Wiederfindungsraten von ca. 0,005 % erreicht wurden, scheinen die geringen Anreicherungsfaktoren eher auf eine geschwächte spezifische Bindung als auf einen zu hohen Hintergrund an unspezifischer Bindung zu deuten. Möglicherweise bleiben Detergensmicellen mit den Lhcb1-Proteinen assoziiert und stören die Bindung durch den Antikörper. Detergensmoleküle können die Interaktion zwischen Antigen und Antikörper schwächen, z.B. benutzten Houshmand et al., 1999 0,1 % SDS zur Elution einzelner Epitope-exprimierender Bakteriophagen von einem Antikörper. Eine bessere Abtrennung von Detergens- und Pigmentmolekülen könnte daher die Effizienz der Immobilisierung deutlich steigern.

4.2.2.2 Selektionsbedingungen

Die Wahl der Selektionsbedingungen ist, wie oben bereits erwähnt, äußerst kritisch für das Gelingen der Selektion. Eine Selektion stabiler LHCIb-Mutanten durch proteolytischen Verdau instabiler Proteine ist nur möglich, wenn zum Zeitpunkt des Trypsinverdau stabile Mutanten möglichst vollständig in Pigment-Protein-Komplexen organisiert vorliegen, während sowohl instabile Mutanten als auch Lhcb1-Wildtyp vollständig entfaltet und damit Trypsin-sensitiv sind.

Experimente, die mit freiem Protein durchgeführt wurden, lassen Zweifel aufkommen, ob diese Situation mit der Temperaturerhöhung auf 37°C tatsächlich erreicht wurde. Zwar ist im Falle der Ausgangsmutante I143H bereits nach 100 sec bei 37°C kaum noch Energietransfer von Chl *b* auf Chl *a* nachweisbar (Abb. 3.32/3.33), nach 30 min Trypsin-Verdau bei 37°C kam es jedoch nicht, wie erwartet, zum rückstandlosen Abbau des Lhcb1-Proteins (Abb. 3.41). Neben dem Degradationsprodukt und Rückständen des Volllängen-Proteins waren noch 6 weitere Fragmente mit Längen zwischen 24 und 12 kDa nachweisbar, deren Identität nicht untersucht wurde. Offensichtlich ist daher nach 30 min bei 37°C noch keine vollständige Entfaltung der Polypeptidkette erreicht, vielmehr deutet das Auftreten dieser Lhcb1-Fragment-Leiter auf lokal begrenzte Entfaltungen des LHCIb-Komplexes hin, die die selektive Zugänglichkeit einzelner Trypsin-Schnittstellen zur Folge haben. Die zu fordernde Existenz partiell entfalteter Zwischenstadien steht im Gegensatz zu der bisherigen Vorstellung eines hochkooperativen Entfaltungsprozesses, der aus der beobachteten Kooperativität der Pigmentbindung abzuleiten ist (Cammarata et al., 1992; Paulsen et al., 1992). Auch die selektive Trypsin-Sensitivität der luminalen Schleifendomäne im Falle der Mutanten mit Aminosäureaustauschen in diesem Bereich (Kap. 3.4.3.3) beweist ja schon, dass partielle Entfaltungen bestimmter Domänen des LHCIb möglich sind.

Die vergleichenden Stabilitätsuntersuchungen zeigten auch, dass das Ausmaß der Entfaltung der luminalen Schleifendomäne in unmittelbarem und möglicherweise ursächlichem Zusammenhang mit der thermischen Stabilität der Pigment-Protein-Komplexe steht (Abb. 3.56). Falls die thermische Denaturierung des Lhcb1-Wildtyp ebenfalls durch lokale Entfaltungen eingeleitet wird, wäre die Proteaseresistenz des Lhcb1-Proteins ein durchaus geeignetes Selektionskriterium, um Mutanten zu selektieren, die eine erhöhte thermische Stabilität zeigen.

In Kap. 3.4.3 zeigte sich allerdings auch, dass die thermische Stabilität und die Stabilität gegenüber SDS nicht unbedingt in Zusammenhang stehen müssen. Um eine gesteigerte Stabilität gegenüber SDS zu erreichen, müsste daher ein anderes Selektionsverfahren gewählt werden. Weiterhin verdeutlicht das Beispiel N183D, dass es stabile Pigment-Protein-Komplexe gibt, die im Vergleich zu Wildtyp-Lhcb1 veränderte Fluoreszenz-Eigenschaften aufweisen. Eine Selektion aufgrund funktionaler Eigenschaften wäre daher sicherlich besser geeignet, allerdings scheiterte die Umsetzung der einzigen denkbaren Möglichkeit, die Selektion anhand der Fluoreszenz in einem FACS-Gerät, an technischen Hindernissen. Eine Reduzierung der Mindest-Partikelgröße für diese Art der Analyse, sowie eine vollständige Abtrennung freier Pigmente nach der Rekonstitution wäre notwendig, um auf diesem Wege eine Selektion stabiler Mutanten zu erreichen.

Die Tatsache, dass während der Selektionsexperimente keine Mutante mit signifikant gesteigerter thermischer Stabilität isoliert werden konnte, könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Bereich des LHCIIB dessen Entfaltung zeitbegrenzend während der thermischen Denaturierung ist, nicht in der Zieldomäne der durchgeführten Mutagenese lag. Wie in Kap. 3.2.1 beschrieben, wurde lediglich der C-terminale Abschnitt des Lhcb1-Proteins ab P147 mutiert. Damit konnten nur Aminosäuren in der stromalen Schleife, der dritten Transmembranhelix und im C-terminalen Bereich des LHCIIB ausgetauscht werden und möglicherweise spielen diese Domänen während der thermischen Denaturierung eine untergeordnete Rolle.

Das Auftreten mehrerer Lhcb1-Fragmente nach einem Trypsinverdau bei 37°C (Abb. 3.41) deutet jedoch eher daraufhin, dass der thermischen Denaturierung mehrere parallele partielle Entfaltungen in verschiedenen Bereichen des LHCIIB voraus gehen. Der Effekt einzelner Aminosäureaustausche ist daher evtl. nicht ausreichend, um zu einem Selektionsvorteil zu führen. Im Falle der Thermolysin-ähnlichen Proteasen wurde gezeigt, dass die Entfaltung an mehreren Stellen gleichzeitig beginnt (Vriend et al., 1998). Einzelne stabilisierende Aminosäureaustausche zeigten in Kombination eine Stabilitätssteigerung, die weit über die Addition der Einzeleffekte hinausging, sofern durch diese Mutationen verschiedene Entfaltungsbereiche stabilisiert wurden (Vriend et al., 1998).

Da zunächst davon ausgegangen wurde, dass die Entfaltung des LHCIIB in einem kooperativen Prozess einem „Alles oder Nichts-Prinzip“ folgt, und keine Zwischenstadien der Entfaltung auftreten, erschien die Immobilisierung der Bakteriophagen, die stabile Lhcb1-Mutanten exprimieren, über Anti-Lhcb1-Antikörper als nahe liegend und geeignet. Falls allerdings die Annahme zutrifft, dass es auch im Falle des Phagen-gebundenen LHCIIB weniger zu einer vollständigen Entfaltung des Lhcb1-Proteins und der vollständigen Trypsin-Sensitivität, als vielmehr zu partiellen Entfaltungen, kommt, könnten Entfaltungen im N-terminalen Bereich des LHCIIB die Selektion stärker behindern als Entfaltungen, die sich in weiter C-terminal-gelegenen Bereichen abspielen. Die partiellen Entfaltungen haben die selektive Zugänglichkeit einzelner Trypsin-Schnittstellen zur Folge. Je weiter N-terminal diese Schnittstellen liegen, desto geringer wird die Wahrscheinlichkeit, dass der verbleibende Lhcb1-Anteil des Fusionsproteins noch ausreichend durch Antikörper gebunden wird, um zur Immobilisierung dieser Mutante zu führen. Geringe Stabilitätsverbesserungen durch reduzierte Entfaltungen C-terminaler Bereiche führten daher womöglich deshalb nicht zu

einem Selektionsvorteil, weil die parallele Entfaltung weiter proximal liegender Domänen einen stärkeren Effekt hatte. Dieses Problem könnte durch die Immobilisierung der Bakteriophagen über einen C-terminalen His-Tag, wie in Finuncane et al., 1999 und Chu et al., 2002, umgangen werden. Eine weitere, sehr elegante Möglichkeit, die Proteaseresistenz mit einem Selektionsvorteil zu koppeln, ist die Expression des Fremdproteins zwischen zwei Domänen eines Bakteriophagenhüllproteins, wobei ein Verlust der C-terminalen Domäne zu nicht-infektiösen Phagenpartikeln führt (Kristensen et al., 1998; Sieber et al., 1998; Martin et al., 2001). Ob allerdings die Rekonstitution des Lhcb1 in diesem Falle noch möglich wäre, ist fraglich.

4.2.3 Wahrscheinlichkeit stabilisierender Mutationen

Wie in Kap. 4.2.1.1/4.2.2.1 beschrieben, wären 2,4 % stabilisierende Mutationen ausreichend gewesen, um eine signifikante Anreicherung thermisch stabiler Mutanten zu erreichen. Obwohl, wie in Kap. 4.2.2.2 beschrieben, auch methodische Einschränkungen bestanden, die die Selektion von Mutanten mit verbesserter thermischer Stabilität verhinderten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die thermische Stabilität des LHCIIB bereits optimiert ist und keine signifikante Stabilitätssteigerung durch Aminosäureaustausche möglich ist.

Wie eingangs erwähnt, spielt unter physiologischen Bedingungen die Adaptivität des pflanzlichen Lichtsammelsystems eine entscheidende Rolle. Falls, wie vermutet, Konformationsänderungen zu veränderten Bindeeigenschaften (Bassi et al. 2000), bzw. zu veränderten Lebenszeiten des ¹Chl*-Anregungszustandes (Gilmore, 1997), führen, ist eine gewisse Flexibilität des Pigment-Protein-Komplexes erforderlich, die möglicherweise die thermische Stabilität reduziert. Außerdem muss gewährleistet sein, dass LHCIIB etwa unter Starklichtbedingungen rasch abgebaut werden kann. Andererseits sollte es unter physiologischen Bedingungen bei hohen Temperaturen, die mit einer intensiven Bestrahlung einhergehen können, nicht zu einem Zerfall der Pigment-Protein-Komplexe und damit zur Freisetzung des Chlorophylls kommen. Ohne die Nähe zu Carotenoiden, die in den Lichtsammelproteinen gewährleistet ist, wäre die Gefahr von Sauerstoff im Singulett-Anregungszustand unvermeidlich und photooxidative Schädigungen des Photosyntheseapparates vorprogrammiert. Zwar werden ELIPs als Chlorophyll-bindende Schutzproteine diskutiert, die Pigment-bindenden Eigenschaften sind allerdings für den Großteil dieser Proteine noch nicht nachgewiesen (Adamska, 2001).

Eine mangelnde thermische Stabilität des LHCIIB könnte demnach unter physiologischen Bedingungen durchaus ein Nachteil sein. Allerdings erscheint eine mittlere Lebenszeit der Pigment-Protein-Komplexe von maximal 50 sec bei 37°C (Kap. 3.2.3.2.1) nicht als ausreichend, um die Freisetzung von Chlorophyllen bei starker Sonneneinstrahlung zu verhindern. Zwar ist anzunehmen, dass unter physiologischen Bedingungen die andere Umgebung und das Vorliegen des LHCIIB in trimerer Form die Stabilität im Vergleich zu *in vitro*-Bedingungen signifikant erhöht, andererseits gibt es auch keinen Beweis dafür, dass der Rückgang des Energietransfers bei 37°C auf eine Freisetzung der Pigmente zurückzuführen ist. In Kap. 3.4.3.3 zeigte sich, dass es Zwischenstadien der Entfaltung geben muss, bei denen die native Struktur in weiten Teilen erhalten bleibt. Es ist nicht auszuschließen, dass diese Zwischenstadien weiterhin Pigmente binden, ohne dass ein Energietransfer von Chl *b* auf Chl *a* zu beobachten ist, bzw. ohne dass es zu einer Fluoreszenz-Emission von Chl *a* kommt. Die Mutante N183D zeigte eben dieses Verhalten, nach Chl *b*-Anregung war keine Chl *a*-Fluoreszenz zu beobachten, obwohl sie zur stabilen Bindung von Pigmenten in der Lage ist (Kap. 3.2.3). Evtl. ist es gerade die Fähigkeit zur lokalen Entfaltung, die die notwendige Adaptivität gewährleistet, ohne eine Freisetzung von Chlorophyll-Molekülen bei erhöhten Temperaturen zu riskieren. Falls diese Annahme zutrifft, könnte die Stabilisierung einzelner Bereiche des LHCIIB, die zur Entfaltung neigen, zu einer signifikanten Steigerung der

thermischen Stabilität der Energie-transferierenden Konformation des Pigment-Protein-Komplexes führen.

Die Ergebnisse der vergleichenden Stabilitätsuntersuchungen (Kap. 3.4.3) zeigten, dass sowohl die Stabilität während einer schwach denaturierenden Gelelektrophorese als auch die Proteaseresistenz der luminalen Schleife mit der mittleren Lebenszeit des Energietransfers bei 37°C korreliert. Offensichtlich ist daher die Entfaltung der luminalen Schleifendomäne der zeitbegrenzende Faktor für den Verlust der Energie-transferierenden Eigenschaften und für die Freisetzung der Chlorophylle. Genauso kam es im Falle von W97R und G101R, die die höchste Trypsinsensitivität der luminalen Schleife zeigten, zu einer beschleunigten vollständigen Degradation des Lhcb1-Proteins (Abb. 3.54). Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass es während einer Denaturierung zumindest teilweise zu einer Auflösung interhelicaler Wechselwirkungen kommt. Stabilisierung dieser interhelicalen Wechselwirkungen könnte sowohl die thermische Stabilität als auch die Stabilität gegenüber SDS signifikant steigern. Allein aus den kristallographischen Daten (Kühlbrandt et al., 1994) erscheint die Anbindung der Helix C an den Rest des Pigment-Protein-Komplexes am labilsten, im Gegensatz zu Helix A und B bestehen keine direkten Wechselwirkungen der Aminosäuren dieser Helix mit Aminosäuren einer der beiden anderen Helices. Aufgrund des großen Abstandes von Helix C zu dem Supercoil aus Helix A und B ist eine verbesserte Anbindung vermutlich weniger durch direkte Interaktionen von Aminosäuren in Helix C und Helix A oder B zu erreichen, als vielmehr durch eine Stabilisierung der Position von Helix C durch die Schleifen-Domänen-Struktur bzw. durch eine verbesserte Pigmentbindung. Eggink et al., 2001, vermuteten, dass insbesondere die Bindung von Chl *a* durch den Austausch weniger affiner Liganden gegen Histidin verbessert werden könnte. Evtl. würde eine verbesserte Chl *a*-Bindung die Stabilität des gesamten Pigment-Protein-Komplexes steigern. Nach den obigen Ausführungen erscheint es allerdings als wahrscheinlich, dass insbesondere die Pigmentbindung im Laufe der Evolution bereits optimiert wurde. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass eine verbesserte Pigmentbindung nicht zwangsläufig zu einer Steigerung der thermischen Stabilität der Energie-transferierenden Konformation des LHCIIB führen würde.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Selektion stabiler Mutanten des LHCIIB beruht letztendlich auf einer Trennung des Pigment-Protein-Komplexes und des ungefalteten Apoproteins. Unter entsprechenden Bedingungen sollten lediglich stabile Mutanten als Pigment-Protein-Komplexe vorliegen und gezielt isoliert werden können. Im ersten Teil der Arbeit wurden verschiedene spezifische Eigenschaften des LHCIIB, Pigment-Bindung, Proteaseresistenz und Zugänglichkeit bestimmter Gruppen für chemische Reaktionen, als Selektionsmerkmale in Betracht gezogen und auf ihre Eignung hin überprüft. Dabei spielte einerseits die Spezifität dieses Merkmals für das rekonstituierte Protein eine Rolle, andererseits ergaben sich auch aus dem Expressionssystem methodische Einschränkungen. Eine Selektion stabiler LHCIIB-Mutanten aufgrund der Trypsin-Resistenz des rekonstituierten Lhcb1-Proteins erwies sich schließlich in Anreicherungsexperimenten als geeignet und wurde zur Selektion stabiler Mutanten aus Zufallsbibliotheken herangezogen.

Die Selektionsexperimente führten nicht zur Identifizierung von Mutanten mit signifikant verbesserter Stabilität. Dagegen war eine Anreicherung des Wildtyp-Lhcb1 bzw. zweier Mutanten mit Wildtyp-Stabilität zu beobachten, weshalb davon auszugehen ist, dass die Selektion im Prinzip erfolgreich verlaufen war. Offensichtlich lagen keine bzw. nicht ausreichend Aminosäureaustausche vor, die unter Selektionsbedingungen von Vorteil waren. Berechnungen zeigten, dass unter den gegebenen Bedingungen mit einer Anreicherung von stabilen Mutanten zu rechnen wäre, wenn 2,4 % der induzierten Aminosäureaustausche unter Selektionsbedingungen einen stabilisierenden Effekt hätten.

Im zweiten Teil der Arbeit zeigte sich, dass die luminalen Schleifendomäne des LHCIIB sowohl zur thermischen Stabilität als auch zur Stabilität gegenüber SDS beiträgt. Für die Stabilität gegenüber SDS scheint ein Netzwerk elektrostatischer Interaktionen, das die Konformation der Schleifendomäne determiniert, von ausschlaggebender Bedeutung zu sein. Die thermische Stabilität beruht dagegen hauptsächlich auf der aromatischen Interaktion zwischen W97 und F195. Die Aminosäureaustausche in der luminalen Schleife begünstigen die partielle Entfaltung dieser Domäne des LHCIIB, ohne dass es zur vollständigen Entfaltung des Lhcb1-Proteins kommt. Die Tendenz der luminalen Schleife zur partiellen Entfaltung korreliert mit der thermischen Stabilität und mit der Stabilität während einer schwach denaturierenden Deriphat-Gelelektrophorese, scheint aber weder für eine Rekonstitution durch Frier-Tau-Zyklen noch für die Stabilität während einer schwach denaturierenden LDS-Gelelektrophorese von Bedeutung zu sein. Offensichtlich stellt die partielle Entfaltung der luminalen Schleifendomäne den zeitlimitierenden Schritt während der thermischen Denaturierung dar, nicht aber während einer Denaturierung durch SDS.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass ein Aminosäureaustausch möglicherweise nicht im gleichen Maße zu einer Steigerung der thermischen und der Stabilität gegenüber SDS führt. Im Rahmen einer Selektion stabiler Mutanten sollte daher zunächst geklärt werden, unter welchen Bedingungen eine gesteigerte Stabilität erwünscht ist.

Die Existenz partiell entfalteter Zwischenstadien steht im Widerspruch zu der bisher gängigen Auffassung der Entfaltung des LHCIIB nach einem „Alles oder Nichts-Prinzip“. Das Vorliegen partiell entfalteter Zwischenstadien anstelle der erwarteten vollständig Trypsin-sensitiven Lhcb1-Proteine, könnte dazu geführt haben, dass Mutationen, die die thermische Stabilität des LHCIIB steigerten, unter Selektionsbedingungen nicht von Vorteil waren.

Ein Nachweis der Existenz und die Identifizierung partiell entfalteter Zwischenstadien des unmutierten LHCIIB, auf die sich aus der vorliegenden Arbeit deutliche Hinweise ergaben, würden die prinzipielle Eignung des entwickelten Selektionssystems bestätigen. Nach geringfügigen Anpassungen der Immobilisierungsmethode und der Auswahl eines stark

begrenzten, geeigneten Zielbereiches der Mutagenese, sollte es möglich sein, mithilfe dieses Systems LHCIib-Mutanten zu selektieren, in denen jeweils eine potentielle Entfaltungsdomäne stabilisiert ist. Durch Kombination der stabilisierenden Mutationen in verschiedenen Entfaltungsdomänen könnte eine signifikante Verbesserung der thermischen Stabilität des LHCIib erreicht werden.

Sequenzen

Sequenz BP1_23 (Sequenziert mit Primer S2)
(Vergleichssequenz in der zweiten Zeile)

AGAACCGtGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
GCTGACCCAGAGACATTTTCGAAGAACCGTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
AlaAspProGluThrPheSerLysAsnArgGluLeuGluValIleHisSerArgTrpAla

ATGTTGGgTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTAAATTC
ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTAAATTC
MetLeuGlyAlaLeuGlyCysValPheProGluLeuLeuSerArgAsnGlyValLysPhe

GGCGAAGCTGTGTGGtTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
GlyGluAlaValTrpPheLysalaGlySerGlnIlePheSerGluGlyGlyLeuAspTyr

TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAgGTT
TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
LeuGlyAsnProSerLeuValHisAlaGlnSerIleLeuAlaIleTrpAlaThrGlnVal

BstEII SphI

ATCTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGtGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
ATcTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
IleLeuMetglyalaValGluGlyTyrArgHisAlaglyGlyProLeuGlyGluValVal

*

GATCCACTTTACCCAGGtGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAgCTGATGATCCASAAGCA
GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
AspProLeuTyrProGlyGlySerPheAspProLeuGlyLeuAlaAspAspProGluAla

TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
PheAlaGluLeuLysValLysGluLeuLysAsnglyArgLeuAlaMetPheSerMetPhe

GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
GlyPhePheValGlnAlaIleValThrGlyLysGlyProLeuGluAsnLeuAlaAspHis

CTTGCAGACCCAGTCAACAACAATGCATGGTCATATGCCACCAACTTTGTTcCCGGAAAA
CTTGCAGACCCAGTCAACAACAATGCATGGtCATATGCCACCAACTTTGTTcCCgGaAAA
LeuAlaAspProValAsnAsnAsnAlaTrpSerTyrAlaThrAsnPheValProGlyLys

CACCATCACCATcACCATTAACCCGGGAAATAAACACTCT
CACCATcACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTCT
HisHisHisHisHisHis

* S = G oder C

Das G-Signal an dieser Stelle ist oft nur klein, es handelt sich vermutlich nur um ein Sequenzierproblem, nicht um einen Austausch.

Sequenz BP1_25 (Sequenziert mit Primer S2)

GCTgaCCCAGAGacaTTCTcCAAGAaCCGTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
 GCTGACCCAGAGACATTCTCCAAGAACCCTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
 AlaAspProGluThrPheSerLysAsnArgGluLeuGluValIleHisSerArgTrpAla

ATGTTGggTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTAAATTC
 ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTAAATTC
 MetLeuGlyAlaLeuGlyCysValPheProGluLeuLeuSerArgAsnGlyValLysPhe

GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GlyGluAlaValTrpPheLysalaGlySerGlnIlePheSerGluGlyGlyLeuAspTyr

TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 LeuGlyAsnProSerLeuValHisAlaGlnSerIleLeuAlaIleTrpAlaThrGlnVal

BstEII SphI

ATCTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 ATcTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 IleLeuMetglyalaValGluGlyTyrArgHisAlaglyGlyProLeuGlyGluValVal

GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 AspProLeuTyrProGlyGlySerPheAspProLeuGlyLeuAlaAspAspProGluAla

TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 PheAlaGluLeuLysValLysGluLeuLysAsnglyArgLeuAlaMetPheSerMetPhe

Pro

GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCCTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
 GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCCTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
 GlyPhePheValGlnAlaIleValThrGlyLysGlyProLeuGluAsnLeuAlaAspHis

SerArgGlu

CTTGCAGACCCAGTCAACAACAATGCATGGTCATATGCCACCAACTTTGtTtCCCGGGAA
 CTTGCAGACCCAGTCAACAACAATGCATGGtCATATGCCACCAACTTTGTTcCCGGAAAA
 LeuAlaAspProValAsnAsnAsnAlaTrpSerTyrAlaThrAsnPheValProGlyLys

IleAsnThrLeuIlePheIleCysPheCysGly

ATAAACACTCTTATATTTATATGtTTTTGtGGAtAGtAATCTTCTTCCCAATTCAATGG
 CACCATcACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTCTTATATTTATATGtTTTTGtG
 HisHisHisHisHisHis

Sequenz BP1_31 (Sequenziert mit Primer S2)

AgAgACATTCTCCAA?AACCGtgAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
 GCTGACCCAGAGACATTCTCCAAGAACCGTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
 AlaAspProGluThrPheSerLysAsnArgGluLeuGluValIleHisSerArgTrpAla

ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAaCGGTGTTAAATTC
 ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTAAATTC
 MetLeuGlyAlaLeuGlyCysValPheProGluLeuLeuSerArgAsnGlyValLysPhe

GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GlyGluAlaValTrpPheLysalaGlySerGlnIlePheSerGluGlyGlyLeuAspTyr

TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 LeuGlyAsnProSerLeuValHisAlaGlnSerIleLeuAlaIleTrpAlaThrGlnVal

BstEII SphI

ATCTTGATGGGAGCTGTGCAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 ATcTTGATGGGAGCTGTGCAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 IleLeuMetglyalaValGluGlyTyrArgHisAlaglyGlyProLeuGlyGluValVal

GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 AspProLeuTyrProGlyGlySerPheAspProLeuGlyLeuAlaAspAspProGluAla

TTTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 TTTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 PheAlaGluLeuLysValLysGluLeuLysAsnglyArgLeuAlaMetPheSerMetPhe

GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAACCTGGAAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
 GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAACCTGGAAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
 GlyPhePheValGlnAlaIleValThrGlyLysGlyProLeuGluAsnLeuAlaAspHis

CTTGCAGACCCAGTCAACAACAATGCATGGTCATATGCCACCAACTTTGTTCCCGGAAAA
 CTTGCAGACCCAGTCAACAACAATGCATGGtCATATGCCACCAACTTTGTTcCCgGaAAA
 LeuAlaAspProValAsnAsnAsnAlaTrpSerTyrAlaThrAsnPheValProGlyLys

XmaI

CACCATCACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTC
 CACCATcACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTC
 HisHisHisHisHisHis

Sequenz BP1_32 (Sequenziert mit Primer S2)

TCCAGATGGGCT
 GCTGACCCAGAGACATTTTCGAAGAACCGTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
 AlaAspProGluThrPheSerLysAsnArgGluLeuGluValIleHisSerArgTrpAla

ATGTTGGGTGCTTTGGGATGNGNCTTcccagAGCTTTTGNCTCGCaacGGNGNNAAttc
 ATGTTGGGTGCTTTGGGATCTGTCTTCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTAAATTC
 MetLeuGlyAlaLeuGlyServalPheProGluLeuLeuSerArgAsnGlyValLysPhe

GGCGAAGCTgNGTGGtTCAAGGCaggATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GlyGluAlaValTrpPheLysalaGlySerGlnIlePheSerGluGlyGlyLeuAspTyr

TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 LeuGlyAsnProSerLeuValHisAlaGlnSerIleLeuAlaIleTrpAlaThrGlnVal

BstEII SphI

ATCTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 ATcTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 IleLeuMetglyalaValGluGlyTyrArgHisAlaglyGlyProLeuGlyGluValVal

GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 AspProLeuTyrProGlyGlySerPheAspProLeuGlyLeuAlaAspAspProGluAla

Leu

TTCGCAGAACTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 TTCGCAGAACTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 PheAlaGluLeuLysValLysGluLeuLysAsnglyArgLeuAlaMetPheSerMetPhe

GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
 GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
 GlyPhePheValGlnAlaIleValThrGlyLysGlyProLeuGluAsnLeuAlaAspHis

CTTGCAGACCCAGtCAACAACAATGCATGGtCATATGCCACCAACTTTGTTCCCGGAAAA
 CTTGCAGACCCAGTCAACAACAATGCATGGtCATATGCCACCAACTTTGTTcCCgGaAAA
 LeuAlaAspProValAsnAsnAsnAlaTrpSerTyrAlaThrAsnPheValProGlyLys

CACCATCACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTC
 CACCATcACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTC
 HisHisHisHisHisHis

Sequenz BP1_33 (Sequenziert mit Primer S2)

GTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
 GCTGACCCAGAGACATTTTCGAAGAACCGTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
 AlaAspProGluThrPheSerLysAsnArgGluLeuGluValIleHisSerArgTrpAla

ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTTAAATTC
 ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTTAAATTC
 MetLeuGlyAlaLeuGlyCysValPheProGluLeuLeuSerArgAsnGlyValLysPhe

GGCGAAGCTGTGTGGTTC AAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GGCGAAGCTGTGTGGTTC AAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GlyGluAlaValTrpPheLysalaGlySerGlnIlePheSerGluGlyGlyLeuAspTyr

TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 LeuGlyAsnProSerLeuValHisAlaGlnSerIleLeuAlaIleTrpAlaThrGlnVal

BstEII SphI

ATCTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 ATcTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 IleLeuMetglyalaValGluGlyTyrArgHisAlaglyGlyProLeuGlyGluValVal

*

GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCASAAGCA
 GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 AspProLeuTyrProGlyGlySerPheAspProLeuGlyLeuAlaAspAspProGluAla

TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 PheAlaGluLeuLysValLysGluLeuLysAsnglyArgLeuAlaMetPheSerMetPhe

Gly

GGATTCTTcGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGGGAACCTTGCTGATCAT
 GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGGGAACCTTGCTGATCAT
 GlyPhePheValGlnAlaIleValThrGlyLysGlyProLeuGluAsnLeuAlaAspHis

cTTGcAGACCCaGTCAACAACAATGCATGGTCATATGCCACCAACTTTGTT
 CTTGCAGACCCAGTCAACAACAATGCATGGTCATATGCCACCAACTTTGTT
 LeuAlaAspProValAsnAsnAsnAlaTrpSerTyrAlaThrAsnPheVal

* siehe BP1_23

Sequenz BP1_34 (Sequenziert mit Primer S2)

tCCAGATGGGCT
 GCTGACCCAGAGACATTTTCGAAGAACCGTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
 AlaAspProGluThrPheSerLysAsnArgGluLeuGluValIleHisSerArgTrpAla

ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTcccagAGCTTTTGTCTCGcaaCGGTGTTAAattc
 ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTTAAATTC
 MetLeuGlyAlaLeuGlyCysValPheProGluLeuLeuSerArgAsnGlyValLysPhe

gGCCAAGCtGtGTGGTTCAAGGCagGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GlyGluAlaValTrpPheLysalaGlySerGlnIlePheSerGluGlyGlyLeuAspTyr

TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 LeuGlyAsnProSerLeuValHisAlaGlnSerIleLeuAlaIleTrpAlaThrGlnVal

BstEII SphI

ATCTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 ATcTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 IleLeuMetglyalaValGluGlyTyrArgHisAlaglyGlyProLeuGlyGluValVal

GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 AspProLeuTyrProGlyGlySerPheAspProLeuGlyLeuAlaAspAspProGluAla

TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 PheAlaGluLeuLysValLysGluLeuLysAsnGlyArgLeuAlaMetPheSerMetPhe

GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGtCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
 GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGtCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
 GlyPhePheValGlnAlaIleValThrGlyLysGlyProLeuGluAsnLeuAlaAspHis

CTTGAGACCCAGTCAACAACAATGCATGGtCATATGCCACCAACTTTGTTCCCGGAAAA
 CTTGAGACCCAGTCAACAACAATGCATGGtCATATGCCACCAACTTTGTTcCCgGaAAA
 LeuAlaAspProValAsnAsnAsnAlaTrpSerTyrAlaThrAsnPheValProGlyLys

XmaI

CACCATCACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTCT
 CACCATcACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTCT
 HisHisHisHisHisHis

Sequenz BP1_35 (Sequenziert mit Primer S2)

CCGtgaGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
 GCTGACCCAGAGACATTTTCGAAGAACCGTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
 AlaAspProGluThrPheSerLysAsnArgGluLeuGluValIleHisSerArgTrpAla

ATGTTGGGTGCTTTgggATGTGTCTTCCAGAGcTTTTGTCTCGcaacGGTGTTAAATTC
 ATGTTGGGTGCTTTGGGATCTGTCTTCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTTAAATTC
 MetLeuGlyAlaLeuGlySerValPheProGluLeuLeuSerArgAsnGlyValLysPhe

GGCGAAGCTGTGtGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GlyGluAlaValTrpPheLysalaGlySerGlnIlePheSerGluGlyGlyLeuAspTyr

TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 LeuGlyAsnProSerLeuValHisAlaGlnSerIleLeuAlaIleTrpAlaThrGlnVal

BstEII SphI

ATCTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 ATcTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 IleLeuMetglyalaValGluGlyTyrArgHisAlaGlyGlyProLeuGlyGluValVal

GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 AspProLeuTyrProGlyGlySerPheAspProLeuGlyLeuAlaAspAspProGluAla

TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 PheAlaGluLeuLysValLysGluLeuLysAsnGlyArgLeuAlaMetPheSerMetPhe

GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
 GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
 GlyPhePheValGlnAlaIleValThrGlyLysGlyProLeuGluAsnLeuAlaAspHis

CTTGCAGACCCAGTCAACAACAATGCATGGTCATATGCCACCAACTTTGTTCCCGGAAAA
 CTTGCAGACCCAGTCAACAACAATGCATGGtCATATGCCACCAACTTTGTTcCCgGaAAA
 LeuAlaAspProValAsnAsnAsnAlaTrpSerTyrAlaThrAsnPheValProGlyLys

CACCATCACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTCT
 CACCATcACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTCT
 HisHisHisHisHisHis

Sequenz BP1_42 (Sequenziert mit Primer S2)

GCTGaCCCAGAGAcATTCTcCAAGAACCCTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
 GCTGACCCAGAGACATTCTCCAAGAACCCTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
 AlaAspProGluThrPheSerLysAsnArgGluLeuGluValIleHisSerArgTrpAla

ATGTTGGgTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTAAATTC
 ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTAAATTC
 MetLeuGlyAlaLeuGlyCysValPheProGluLeuLeuSerArgAsnGlyValLysPhe

GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GlyGluAlaValTrpPheLysalaGlySerGlnIlePheSerGluGlyGlyLeuAspTyr

TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 LeuGlyAsnProSerLeuValHisAlaGlnSerIleLeuAlaIleTrpAlaThrGlnVal

BstEII SphI

ATCTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 ATcTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 IleLeuMetglyalaValGluGlyTyrArgHisAlaglyGlyProLeuGlyGluValVal

GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 AspProLeuTyrProGlyGlySerPheAspProLeuGlyLeuAlaAspAspProGluAla

TTTCGAGAATTGAAGGTGAAGGAACCTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 TTTCGAGAATTGAAGGTGAAGGAACCTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 PheAlaGluLeuLysValLysGluLeuLysAsnglyArgLeuAlaMetPheSerMetPhe

Gly

GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGGGAACCTTGCTGATCAT
 GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGGGAACCTTGCTGATCAT
 GlyPhePheValGlnAlaIleValThrGlyLysGlyProLeuGluAsnLeuAlaAspHis

CTTGCAGACCCAGTCAACAACAATGCATGGTCATATGCCACCAACTTTGTTCCCGGAAAA
 CTTGCAGACCCAGTCAACAACAATGCATGGtCATATGCCACCAACTTTGTTcCCgGaAAA
 LeuAlaAspProValAsnAsnAsnAlaTrpSerTyrAlaThrAsnPheValProGlyLys

XmaI

CACCATCACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTCT
 CACCATcACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTCT
 HisHisHisHisHisHis

Sequenz Bp1_43 (Sequenziert mit Primer S2)

gtCATCCaCTCCAGATGGGCT
 GCTGACCCAGAGACATTTTCGAAGAACCGTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
 AlaAspProGluThrPheSerLysAsnArgGluLeuGluValIleHisSerArgTrpAla

ATGTtGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCccagAGCTTTTGTCTCGCAaCGGTGTTAAattc
 ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTAAATTC
 MetLeuGlyAlaLeuGlyCysValPheProGluLeuLeuSerArgAsnGlyValLysPhe

GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GlyGluAlaValTrpPheLysalaGlySerGlnIlePheSerGluGlyGlyLeuAspTyr

TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 LeuGlyAsnProSerLeuValHisAlaGlnSerIleLeuAlaIleTrpAlaThrGlnVal

BstEII SphI

ATCTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 ATcTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 IleLeuMetglyalaValGluGlyTyrArgHisAlaglyGlyProLeuGlyGluValVal

GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 AspProLeuTyrProGlyGlySerPheAspProLeuGlyLeuAlaAspAspProGluAla

TTTCGAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 TTTCGAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 PheAlaGluLeuLysValLysGluLeuLysAsnglyArgLeuAlaMetPheSerMetPhe

Gly

GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGGGAACCTTGCTGATCAT
 GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGGGAACCTTGCTGATCAT
 GlyPhePheValGlnAlaIleValThrGlyLysGlyProLeuGluAsnLeuAlaAspHis

CTTGCAGACCCAGTCAACAACAATGCATGGTCATATGCCACCAACTTTGTTCCCGGAAAA
 CTTGCAGACCCAGTCAACAACAATGCATGGtCATATGCCACCAACTTTGTTcCCgGAAAA
 LeuAlaAspProValAsnAsnAsnAlaTrpSerTyrAlaThrAsnPheValProGlyLys

GlnProLeuThrArgGluIleAsnThrLeuIlePheIleCysPheTrpAsp

CACCATCACCACCATTAAACCCGGGAAATAAACACTCTTATATtTaTATGTTTTTGGGAt
 CACCATcACCATCACCATTAAACCCGGGAAATAAACACTCTTATATTTATATGtTTTTGtG
 HisHisHisHisHisHisHis

SerAsnLeuLeuProAsnSerMet**Stop**
 AGtAATCTTCTCCCAATTCAATgtGAAtTATTATCATT

Sequenz BP3_1

GCTGaCCCAGAGACATtCTCCAAGAACCGTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
 GCTGACCCAGAGACATtCTCCAAGAACCGTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
 AlaAspProGluThrPheSerLysAsnArgGluLeuGluValIleHisSerArgTrpAla

ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTTAAATTC
 ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTTAAATTC
 MetLeuGlyAlaLeuGlyCysValPheProGluLeuLeuSerArgAsnGlyValLysPhe

GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GlyGluAlaValTrpPheLysalaGlySerGlnIlePheSerGluGlyGlyLeuAspTyr

TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 LeuGlyAsnProSerLeuValHisAlaGlnSerIleLeuAlaIleTrpAlaThrGlnVal

BstEII SphI

ATCTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 ATCTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 IleLeuMetglyalaValGluGlyTyrArgHisAlaglyGlyProLeuGlyGluValVal

GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTA_gCTGATGATCCAGAAGCA
 GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 AspProLeuTyrProGlyGlySerPheAspProLeuGlyLeuAlaAspAspProGluAla

TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 PheAlaGluLeuLysValLysGluLeuLysAsnglyArgLeuAlaMetPheSerMetPhe

GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
 GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
 GlyPhePheValGlnAlaIleValThrGlyLysGlyProLeuGluAsnLeuAlaAspHis

CTTGCAGACCCAGTCAACAACAATGCATGGTCATATGCCACCAACTTTGTTCCCGGAAAA
 CTTGCAGACCCAGTCAACAACAATGCATGGtCATATGCCACCAACTTTGTTcCCgGaAAA
 LeuAlaAspProValAsnAsnAsnAlaTrpSerTyrAlaThrAsnPheValProGlyLys

XmaI

CACCATCACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTCT
 CACCATcACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTCT
 HisHisHisHisHisHis

Sequenz Bp3_7

GaAGTCATCCaCTCCAGATGGGCT

GCTGACCCAGAGACATTTTCGAAGAACCCTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
AlaAspProGluThrPheSerLysAsnArgGluLeuGluValIleHisSerArgTrpAla

ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTAAATTC
ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTAAATTC
MetLeuGlyAlaLeuGlyCysValPheProGluLeuLeuSerArgAsnGlyValLysPhe

GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
GlyGluAlaValTrpPheLysalaGlySerGlnIlePheSerGluGlyGlyLeuAspTyr

TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
LeuGlyAsnProSerLeuValHisAlaGlnSerIleLeuAlaIleTrpAlaThrGlnVal

BstEII SphI

ATCTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
ATcTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
IleLeuMetglyalaValGluGlyTyrArgHisAlaglyGlyProLeuGlyGluValVal

GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
AspProLeuTyrProGlyGlySerPheAspProLeuGlyLeuAlaAspAspProGluAla

TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
PheAlaGluLeuLysValLysGluLeuLysAsnglyArgLeuAlaMetPheSerMetPhe

GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
GlyPhePheValGlnAlaIleValThrGlyLysGlyProLeuGluAsnLeuAlaAspHis

CTTGACAGCCAGTCAACAACAATGCATGGTCATATGCCACCAACTTTGTTCCCGGAAAA
CTTGACAGCCAGTCAACAACAATGCATGGTCATATGCCACCAACTTTGTTCCCGGAAAA
LeuAlaAspProValAsnAsnAsnAlaTrpSerTyrAlaThrAsnPheValProGlyLys

XmaI

CACCATCACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTCT
CACCATcACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTCT
HisHisHisHisHisHis

Sequenz BP3_8

CT
 GCTGACCCAGAGACATTTTCGAAGAACCCTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
 AlaAspProGluThrPheSerLysAsnArgGluLeuGluValIleHisSerArgTrpAla

ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTAAATTC
 ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTAAATTC
 MetLeuGlyAlaLeuGlyCysValPheProGluLeuLeuSerArgAsnGlyValLysPhe

GGcGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GlyGluAlaValTrpPheLysalaGlySerGlnIlePheSerGluGlyGlyLeuAspTyr

TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 LeuGlyAsnProSerLeuValHisAlaGlnSerIleLeuAlaIleTrpAlaThrGlnVal

BstEII SphI
 ATCTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 ATcTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 IleLeuMetglyalaValGluGlyTyrArgHisAlaglyGlyProLeuGlyGluValVal

GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 AspProLeuTyrProGlyGlySerPheAspProLeuGlyLeuAlaAspAspProGluAla

TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 PheAlaGluLeuLysValLysGluLeuLysAsnglyArgLeuAlaMetPheSerMetPhe

Asp
 GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAACCTGGAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGACCAT
 GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAACCTGGAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
 GlyPhePheValGlnAlaIleValThrGlyLysGlyProLeuGluAsnLeuAlaAspHis

CTTGACAGCCAGTCAACAACAATGCATGGTCATATGCCACCAACTTTGTTCCCGGAAAA
 CTTGACAGCCAGTCAACAACAATGCATGGTCATATGCCACCAACTTTGTTCCCGGAAAA
 LeuAlaAspProValAsnAsnAsnAlaTrpSerTyrAlaThrAsnPheValProGlyLys

XmaI
 CACCATCACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTCT
 CACCATcACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTCT
 HisHisHisHisHisHis

Sequenz BP3_9

TCATCCACTCCAGATGGGCT
 GCTGACCCAGAGACATTTTCGAAGAACCCTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
 AlaAspProGluThrPheSerLysAsnArgGluLeuGluValIleHisSerArgTrpAla

ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTAAATTC
 ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTAAATTC
 MetLeuGlyAlaLeuGlyCysValPheProGluLeuLeuSerArgAsnGlyValLysPhe

GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GlyGluAlaValTrpPheLysalaGlySerGlnIlePheSerGluGlyGlyLeuAspTyr

TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 LeuGlyAsnProSerLeuValHisAlaGlnSerIleLeuAlaIleTrpAlaThrGlnVal

BstEII SphI

ATCTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 ATcTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 IleLeuMetglyalaValGluGlyTyrArgHisAlaglyGlyProLeuGlyGluValVal

Leu

GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCCTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCCTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 AspProLeuTyrProGlyGlySerPheAspProLeuGlyLeuAlaAspAspProGluAla

TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 PheAlaGluLeuLysValLysGluLeuLysAsnglyArgLeuAlaMetPheSerMetPhe

GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
 GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
 GlyPhePheValGlnAlaIleValThrGlyLysGlyProLeuGluAsnLeuAlaAspHis

CTTGACAGCCAGTCAACAACAATGCATGGTCATATGCCACCAACTTTGtTCCCGGAAAA
 CTTGACAGCCAGTCAACAACAATGCATGGtCATATGCCACCAACTTTGTTcCCgGAAAA
 LeuAlaAspProValAsnAsnAsnAlaTrpSerTyrAlaThrAsnPheValProGlyLys

XmaI

CACCATCACCATCACCATTAACCCgGGAAATAAACACTCT
 CACCATcACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTCT
 HisHisHisHisHisHis

Sequenz BP3_10

cT

GCTGACCCAGAGACATTTTCGAAGAACCCTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
AlaAspProGluThrPheSerLysAsnArgGluLeuGluValIleHisSerArgTrpAla

ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTAAATTC
ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTAAATTC
MetLeuGlyAlaLeuGlyCysValPheProGluLeuLeuSerArgAsnGlyValLysPhe

GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
GlyGluAlaValTrpPheLysalaGlySerGlnIlePheSerGluGlyGlyLeuAspTyr

TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
LeuGlyAsnProSerLeuValHisAlaGlnSerIleLeuAlaIleTrpAlaThrGlnVal

BstEII SphI

ATCTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
ATcTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
IleLeuMetglyalaValGluGlyTyrArgHisAlaGlyGlyProLeuGlyGluValVal

GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
AspProLeuTyrProGlyGlySerPheAspProLeuGlyLeuAlaAspAspProGluAla

TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
PheAlaGluLeuLysValLysGluLeuLysAsnGlyArgLeuAlaMetPheSerMetPhe

GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
GlyPhePheValGlnAlaIleValThrGlyLysGlyProLeuGluAsnLeuAlaAspHis

CTTGACAGCCAGTCAACAACAATGCATGGTCATATGCCACCAACTTTgTTCCcGGAAAA
CTTGACAGCCAGTCAACAACAATGCATGGtCATATGCCACCAACTTTGTTcCCgGAAAA
LeuAlaAspProValAsnAsnAsnAlaTrpSerTyrAlaThrAsnPheValProGlyLys

XmaI

CACCATCACCATCaCCATTAACCCGGGgAAATAAACACTCT
CACCATcACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTCT
HisHisHisHisHisHisHis

Sequenz BP3_13

GCTgaCCCAGAgACATTCTCGAAGAACCGTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
 GCTGACCCAGAGACATTCTCGAAGAACCGTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
 AlaAspProGluThrPheSerLysAsnArgGluLeuGluValIleHisSerArgTrpAla

ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTTAAATTC
 ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTTAAATTC
 MetLeuGlyAlaLeuGlyCysValPheProGluLeuLeuSerArgAsnGlyValLysPhe

GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GlyGluAlaValTrpPheLysalaGlySerGlnIlePheSerGluGlyGlyLeuAspTyr

TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 LeuGlyAsnProSerLeuValHisAlaGlnSerIleLeuAlaIleTrpAlaThrGlnVal

BstEII SphI

ATCTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 ATcTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 IleLeuMetglyalaValGluGlyTyrArgHisAlaGlyGlyProLeuGlyGluValVal

GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 AspProLeuTyrProGlyGlySerPheAspProLeuGlyLeuAlaAspAspProGluAla

TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 PheAlaGluLeuLysValLysGluLeuLysAsnGlyArgLeuAlaMetPheSerMetPhe

GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
 GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
 GlyPhePheValGlnAlaIleValThrGlyLysGlyProLeuGluAsnLeuAlaAspHis

CTTGCAGACCCAGTCAACAACAATGCATGGTCATATGCCACCAACTTTGTTCCCGGAAAA
 CTTGCAGACCCAGTCAACAACAATGCATGGtCATATGCCACCAACTTTGTTcCCgGaAAA
 LeuAlaAspProValAsnAsnAsnAlaTrpSerTyrAlaThrAsnPheValProGlyLys

XmaI

CACCATCACCATCACCATTAACCCgGGAAATAAACACTCTTATATTTATATGTTTTTGTg
 CACCATcACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTCTTATATTTATATGtTTTTGTg
 HisHisHisHisHisHis

Sequenz BP3_16

GCTGACCCAGAGACATTCTCGAAGAACCCTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
 GCTGACCCAGAGACATTCTCGAAGAACCCTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
 AlaAspProGluThrPheSerLysAsnArgGluLeuGluValIleHisSerArgTrpAla

ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTTAAATTC
 ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTTAAATTC
 MetLeuGlyAlaLeuGlyCysValPheProGluLeuLeuSerArgAsnGlyValLysPhe

GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GlyGluAlaValTrpPheLysalaGlySerGlnIlePheSerGluGlyGlyLeuAspTyr

TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 LeuGlyAsnProSerLeuValHisAlaGlnSerIleLeuAlaIleTrpAlaThrGlnVal

BstEII SphI

ATCTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 ATcTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 IleLeuMetGlyAlaValGluGlyTyrArgHisAlaGlyGlyProLeuGlyGluValVal

GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 AspProLeuTyrProGlyGlySerPheAspProLeuGlyLeuAlaAspAspProGluAla

Asp

TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGGACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 PheAlaGluLeuLysValLysGluLeuLysAsnGlyArgLeuAlaMetPheSerMetPhe

GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
 GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
 GlyPhePheValGlnAlaIleValThrGlyLysGlyProLeuGluAsnLeuAlaAspHis

CTTGACAGCCAGTCAACAACAATGCATGGTCATATGCCACCAACTTTGTTCCCGGAAAA
 CTTGACAGCCAGTCAACAACAATGCATGGtCATATGCCACCAACTTTGTTcCCgGAAAA
 LeuAlaAspProValAsnAsnAsnAlaTrpSerTyrAlaThrAsnPheValProGlyLys

XmaI

CACCATCACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTCT
 CACCATcACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTCT
 HisHisHisHisHisHis

Sequenz BP3_18

GCTGACCCAGAGACATTCTCCAAGAACCGTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
 GCTGACCCAGAGACATTTTCCAAGAACCGTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
 AlaAspProGluThrPheSerLysAsnArgGluLeuGluValIleHisSerArgTrpAla

ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTTAAATTC
 ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTTAAATTC
 MetLeuGlyAlaLeuGlyCysValPheProGluLeuLeuSerArgAsnGlyValLysPhe

GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GlyGluAlaValTrpPheLysalaGlySerGlnIlePheSerGluGlyGlyLeuAspTyr

TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 LeuGlyAsnProSerLeuValHisAlaGlnSerIleLeuAlaIleTrpAlaThrGlnVal

BstEII SphI

ATCTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 ATcTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 IleLeuMetGlyAlaValGluGlyTyrArgHisAlaglyGlyProLeuGlyGluValVal

GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 AspProLeuTyrProGlyGlySerPheAspProLeuGlyLeuAlaAspAspProGluAla

Asp

TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACCTCAAGGACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACCTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 PheAlaGluLeuLysValLysGluLeuLysAsnGlyArgLeuAlaMetPheSerMetPhe

GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
 GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
 GlyPhePheValGlnAlaIleValThrGlyLysGlyProLeuGluAsnLeuAlaAspHis

CTTGACAGACCCAGTCAACAACAATGCATGGTCATATGCCACCAACTTTGTTCCCGGAAAA
 CTTGACAGACCCAGTCAACAACAATGCATGGtCATATGCCACCAACTTTGTTcCCgGaAAA
 LeuAlaAspProValAsnAsnAsnAlaTrpSerTyrAlaThrAsnPheValProGlyLys

XmaI

CACCATCACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTCT
 CACCATcACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTCT
 HisHisHisHisHisHis

Sequenz BP2_20

aAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
 GCTGACCCAGAGACATTTTCGAAGAACCCTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCT
 AlaAspProGluThrPheSerLysAsnArgGluLeuGluValIleHisSerArgTrpAla

ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTTAAATTC
 ATGTTGGGTGCTTTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTTAAATTC
 MetLeuGlyAlaLeuGlyCysValPheProGluLeuLeuSerArgAsnGlyValLysPhe

GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GGCGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTAC
 GlyGluAlaValTrpPheLysAlaGlySerGlnIlePheSerGluGlyGlyLeuAspTyr

TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 TTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTT
 LeuGlyAsnProSerLeuValHisAlaGlnSerIleLeuAlaIleTrpAlaThrGlnVal

BstEII SphI

ATCTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 ATcTTGATGGGAGCTGTCTGAAGGTTACCGGCATGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTT
 IleLeuMetglyalaValGluGlyTyrArgHisAlaGlyGlyProLeuGlyGluValVal

GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 GATCCACTTTACCCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCA
 AspProLeuTyrProGlyGlySerPheAspProLeuGlyLeuAlaAspAspProGluAla

TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 TTCGCAGAATTGAAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTT
 PheAlaGluLeuLysValLysGluLeuLysAsnglyArgLeuAlaMetPheSerMetPhe

GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAACCTGGAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
 GGATTCTTCGTTCAAGCTATTGTAACCTGGAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCAT
 GlyPhePheValGlnAlaIleValThrGlyLysGlyProLeuGluAsnLeuAlaAspHis

CTTGACAGCCAGTCAACAACAATGCATGGTCATATGCCACCAACTTTGTTcCCGGAAAA
 CTTGACAGCCAGTCAACAACAATGCATGGtCATATGCCACCAACTTTGTTcCCgGAAAA
 LeuAlaAspProValAsnAsnAsnAlaTrpSerTyrAlaThrAsnPheValProGlyLys

XmaI

CACCATCACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTCT
 CACCATcACCATCACCATTAACCCGGGAAATAAACACTCT
 HisHisHisHisHisHis

Literaturverzeichnis

- Adamska, I. (2001).** The Elip Family of Stress Proteins in the Thylakoid Membranes of Pro- and Eukaryota. In: Aro, E.M.; Andersson, B. (Hrsg.) Regulation of Photosynthesis. Vol. 8. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 487-505
- Allen, S.; Kim, J.-M.; Khorana, H. G.; Lu, H. und Booth, P. (2001).** Structure and Function in Bacteriorhodopsin: The Effect of the Interhelical Loops on the Protein Folding Kinetics. *Journal of Molecular Biology* 308, 423-435
- Bassi, R.; Rigoni, F. und Giacometti, G.M. (1990).** Chlorophyll binding proteins with antenna function in higher plants and green algae. *Photochemistry and Photobiology* 52, 1187-1206
- Bassi, R., Pineau, B., Dainese, P. und Marquardt, J. (1993).** Carotenoid-binding proteins of photosystem II. *European Journal of Biochemistry* 212, 297-303
- Bassi, R. und Caffarri, S. (2000).** Lhc proteins and the regulation of photosynthetic light harvesting function by xanthophylls. *Photosynthesis Research* 64, 243-256
- Boekema, E.J.; van Roon, H.; Calkoen, F.; Bassi, R. und Dekker, J. P. (1999).** Multiple types of association of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *Biochemistry* 38, 2233-2239
- Booth, P. J. und Paulsen, H. (1996).** Assembly of Light-Harvesting Chlorophyll *a/b* Complex *in Vitro*. Time-Resolved Fluorescence Measurements. *Biochemistry* 35, 5103-5108
- Bowie, J. U. (2001).** Stabilizing membrane proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 11, 397-402
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stueber, D., Mueller, M., Ibrahim, I., Haeuple, M.T. und Dobberstein, B. (1987).** A T5-promoter-based transcription-translation system for the analysis of protein expression *in vivo* and *in vitro*. *Methods in Enzymology* 155, 416-433
- Burley, S. K. und Petsko, G. A. (1986).** Dimerization Energetics of Benzene and Aromatic Amino Acid Side Chains. *Journal of the American Chemical Society* 108, 7995-8001
- Cadwell, R. C. und Joyce, G. F. (1995).** Randomization of Genes by PCR Mutagenesis. *PCR Methods and Applications* 2, 28-33
- Cammarata, K. V. und Schmidt, G. W. (1992).** *In Vitro* Reconstitution of a Light-Harvesting Gene Product: Deletion Mutagenesis and Analysis of Pigment Binding. *Biochemistry* 31, 2779-2789
- Cashmore, A. R. (1984).** Structure and expression of pea nuclear gene encoding a chlorophyll *a/b*-binding polypeptide. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 81, 2960-2964
- Chen, B. und Przybyla, A. E. (1994).** An efficient site-directed mutagenesis method based on PCR. *Bio Techniques* 17, 657-659
- Christ, C. (1998).** Einführung von Restriktionsspaltstellen in rekombinantes Lichtsammelgen und anschließende Domänen-spezifische Zufallsmutagenese. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg Universität Mainz
- Chu, R., Takei, J., Knowlton, J.R.; Andrykovitch, M., Pei, W., Kajava, A.V., Steinbach, P.J., Ji, X. und Bai, Y. (2002).** Redesign of a Four-helix Bundle Protein by Phage Display Coupled with Proteolysis and Structural Characterization by NMR and X-ray Crystallography. *Journal of Molecular Biology* 323, 253-262
- Condron, B. G.; Atkins, J. F. und Gesteland, R. F. (1991).** Frameshifting in Gene 10 of Bacteriophage T7. *Journal of Bacteriology* 173 (21), 6998-7003

- Croce, R.; Remelli, R.; Varotto, C.; Breton, J. und Bassi, R. (1999).** The neoxanthin binding site of the major light harvesting complex (LHCII) from higher plants. *FEBS Letters* 456, 1-6
- Demmig-Adams, B. (1990).** Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1020, 1-24
- Dolganov, N. A.; Bhaya, D. und Grossman, A. R. (1995).** Cyanobacterial protein with similarity to the chlorophyll *a/b* binding proteins of higher plants: Evolution and regulation. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 92, 636-640
- Dunn, J. J. und Studier, W. F. (1983).** Complete Nucleotide Sequence of Bacteriophage T7 DNA and the Locations of T7 Genetic Elements. *Journal of Molecular Biology* 166, 477-535
- Eggert, K. (2000).** Zufallsmutagenese in der luminalen Schleife des Lichtsammelkomplexes II. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg Universität Mainz
- Eggink, L. L.; Park, H. und Hooper, J. K. (2001).** The role of chlorophyll *b* in photosynthesis: Hypothesis. *BMC Plant Biology* 1: 2
- Finucane, M. D. Tuna, M., Lees, J. H. und Woolfson, D. N. (1999).** Core-Directed Protein Design. I. An Experimentall Method for Selecting Stable Proteins form Combinatorial Libraries. *Biochemistry* 38, 11604-11612
- Finucane, M. D. and Woolfson, D. (1999).** Core-Directed Protein Design. II. Rescue of a Multiply Mutated and Destabilized Variant of Ubiquitin. *Biochemistry* 38, 11613-11623
- Formaggio, E.; Cinque, G. und Bassi, R. (2001).** Functional Architecture of the Major Light-Harvesting Complex from Higher Plants. *Journal of Molecular Biology* 314, 1157-1166
- Frank, H. A.; Bautista, J. A.; Josue, J. S. und Young, A. J. (2000).** Mechanism of non-photochemical quenching in green plants: energies of the lowest excited singlet states of violaxanthin and zeaxanthin. *Biochemistry* 39, 2831-2837
- Funk, C.; Schröder, W. P.; Green, B. R.; Renger, G. und Andersson, B. (1994).** The intrinsic 22 kDa protein is a chlorophyll-binding subunit of photosystem II. *FEBS Letters* 342, 261-266
- Funk, C. und Vermaas, W. (1999).** A Cyanobacterial Gene Family Coding for Single-Helix Proteins Resembling Part of the Light-Harvesting Proteins from Higher Plants. *Biochemistry* 38, 9397-9404
- Geister, S. (2003).** Stabilität des Lichtsammlerkomplexes LHCIIb. Mutationsanalyse der luminalen Schleife. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Gilbert, W. A.; Lord, R. C.; Petsko, G. A. und Thamann, T. J. (1982).** Laser-Raman Spectroscopy of Biomolecules - Temperature Dependence of the Conformation of Crystalline Ribonuclease A from X-Ray Diffraction and Raman Spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* 12, 173-179
- Gilles-Gonzalez, M. A.; Engelman, D. M. und Khorana, H. G. (1991).** Structure-Function Studies of Bacteriorhodopsin XV. *The Journal of Biological Chemistry* 266, 8545-8550
- Gilmore, A. M. (1997).** Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiologia Plantarum* 99, 197-209
- Green, B. R. und Pichersky, E. (1994).** Hypothesis for the evolution of three-helix Chl *a/b* and Chl *a/c* light-harvesting antenna protiens from two-helix and four-helix ancestors. *Photosynthesis Research* 39, 149-162
- Green, B. und Kühlbrandt, W. (1995).** Sequence conservation of light-harvesting and stress-response proteins in relation to the three-dimensional molecular structure of LHCII. *Photosynthesis Research* 44, 139-148

- Green, B. R. and Durnford, D. G. (1996).** The Chlorophyll-Carotenoid Proteins of Oxygenic Photosynthesis. *Annual Reviews Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 685-714
- Haltia, T. und Freire, E. (1995).** Forces and factors that contribute to the structural stability of membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1241, 295-322
- He, M.; Wilde, A. und Kaderbhai, M. A. (1990).** A simple single-step Procedure for small-scale preparation of Escherichia coli plasmids. *Nucleic Acids Research* 18, 1660
- Heinemann, B. und Paulsen, H. (1999).** Random Mutations Directed to Transmembrane and Loop Domains of the Light-Harvesting Chlorophyll *a/b* Protein: Impact on Pigment Binding. *Biochemistry* 38, 14088-14093
- Heinemann, B. (2000).** Random mutations directed to transmembrane and loop domains of light-harvesting chlorophyll *a/b* protein: Impact on complex formation and pigment binding. Dissertation am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg Universität Mainz
- Hobe, S.; Niemeier, H.; Bender, A. (2000).** Carotenoid binding sites in LHCIIb. *European Journal of Biochemistry* 267, 616-624
- Hobe, S.; Fey, H.; Rogl, H. und Paulsen, H. (2003).** Determination of Relative Chlorophyll Binding Affinities in the Major Light-harvesting Chlorophyll *a/b* Complex. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 5912-5919
- Hori, T., Moriyama, H., Kawaguchi, J., Hayashi-Iwasaki, Y., Oshima, T. und Tanake, N. (2000).** The initial step of the thermal unfolding of 3-isopropylmalate dehydrogenase detected by the temperature-jump Laue method. *Protein Engineering* 13, 527-533
- Horn, R. und Paulsen, H. (2002).** Folding *In Vitro* of Light-harvesting Chlorophyll *a/b* Protein is Coupled with Pigment Binding. *Journal of Molecular Biology* 318, 547-556
- Horton, P.; Ruban, A. V. und Walters, R. G. (1994).** Regulation of Light harvesting in green plants Indication by Nonphotochemical Quenching of Chlorophyll Fluorescence *Plant Physiology* 106, 415-420
- Horton, P.; Ruban, A. V. und Walters, R. G. (1996).** Regulation of Light harvesting in green plants. *Annual Reviews Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 655-684
- Houshmand, H.; Fröman, G. und Magnusson, G. (1999).** Use of Bacteriophage T7 Displayed Peptides for Determination of Monoclonal Antibody Specificity and Biosensor Analysis of the Binding Reaction. *Analytical Biochemistry* 268, 363-370
- Huang, K.-S.; Bayley, H.; Liao, M.-J. ; London, E. und Khorana, H. G. (1981).** Refolding of an Integral Membrane Protein: Denaturation, Renaturation, and Reconstitution of Intact Bacteriorhodopsin and two proteolytic fragments. *The Journal of Biological Chemistry* 256, 3802-3809
- Hubbard, S.J., Eisenmenger, F. und Thornton, J.M. (1994).** Modeling studies of the change in conformation required for cleavage of limited proteolytic sites. *Protein Science* 3, 757-768
- Hunter, C. A.; Singh J. und Thornton, J. M. (1991).** π - π Interactions; the Geometry and Energetics of Phenylalanine-Phenylalanine Interactions in Proteins. *Journal of Molecular Biology* 218, 837-846
- Jahns, P.; Wehner, A.; Paulsen, H. und Hobe, S. (2001).** De-epoxidation of Violaxanthin after Reconstitution into Different Carotenoid Binding Sites of Light-harvesting Complex II. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 22154-22159
- Jansson, S.; Pichersky, E.; Bassi, R.; Green, B. R.; Ikeuchi, M.; Melis, A.; Simpson, D. J.; Spangfort, M.; Staehelin, L. A. und Thornber, J. P. (1992).** A nomenclature for the genes

encoding the chlorophyll *a/b*-binding-proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 10, 242-253

Jansson, S. (1994). Review: The light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1184, 1-19

Javadpour, M. M.; Eilers, M.; Groesbeek, M. und Smith, S. O. (1999). Helix Packing in Polytropic Membrane Proteins: Role of Glycine in Transmembrane Helix Association. *Biophysical Journal* 77, 1609-1618

Kahn, T. W. und Engelman, D. M. (1992). Bacteriorhodopsin Can Be Refolded from Two Independently Stable Transmembrane Helices and the Complementary Five-Helix Fragment. *Biochemistry* 31, 6144-6151

Kay, B. K. und Hoess, R. H. (1996). Principles and Applications of Phage Display. In: Kay, Brian K.; Winter, Jill and McCafferty, John (Hrsg.) Phage Display of Peptides and Proteins. A Laboratory Manual. (1996) Academic Press, Inc. San Diego, USA

Kim, S. J.; Sandusky, P.; Bowlgy, N. R.; Aebersold, R.; Green, B. R.; Vlahakis, S.; Yokum, C. F. und Pichersky, E. (1992). Characterization of a spinach *psbS* cDNA encoding the 22 kDa protein of photosystem II. *FEBS Letters* 314, 67-71

Kim, J.-M.; Booth, P. J.; Allen, S. J. und Khorana, H. G. (2001). Structure and Function in Bacteriorhodopsin: The Role of the Interhelical Loops in the Folding and Stability of Bacteriorhodopsin. *Journal of Molecular Biology* 308, 409-422

Kristensen, P. und Winter, G. (1998). Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages. *Folding & Design* 3, 321-328

Kühlbrandt, W.; Wang, D. N. und Fujiyoshi, Y. (1994). Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367, 614-621

Lämmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

Lau, F. W. und Bowie, J. U. (1997). A Method for Assessing the Stability of a Membrane Protein. *Biochemistry* 36, 5884-5892

Lau, F. W.; Nauli, S.; Zhou, Y. und Bowie, J. U. (1999). Changing Single Side-chains can Greatly Enhance the Resistance of a Membrane Protein to Irreversible Inactivation. *Journal of Molecular Biology* 290, 559-564

Lee, A. und Thornber, J. P. (1995). Analysis of the pigment stoichiometry of pigment-protein complexes from barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Physiology* 107, 565-574

Leung, D. W. ; Chen, E. und Goeddel, D. V. (1989). A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique* 1, 11-15

Liao, M.-J.; London, E. und Khorana, H. G. (1983). Regeneration of the Native Bacteriorhodopsin Structure from Two Chymotryptic Fragments. *The Journal of Biological Chemistry* 258, 9949-9955

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

Lindahl, M.; Yang, D.-H. und Andersson, B. (1995). Regulatory proteolysis of the major light-harvesting chlorophyll *a/b* protein of photosystem II by a light-induced membrane-associated enzymic system. *European Journal of Biochemistry* 231, 503-509

- Marti, T. (1998).** Refolding of Bacteriorhodopsin from Expressed Polypeptide Fragments. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 9312-9322
- Martin, A., Sieber, V. und Schmid, F. X. (2001).** In-vitro Selection of Highly Stabilized Protein Variants with Optimized Surface. *J. Mol. Biol.* 309, 717-726
- Morosinotto, T.; Baronio, R. und Bassi, R. (2002).** Dynamics of Chromophore Binding to Lhc Proteins in Vivo and in Vitro during Operation of the Xanthophyll Cycle. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 36913-36920
- Morosinotto, T.; Caffarri, S.; Dall'Osto, L. und Bassi, R. (2003).** Mechanistic aspects of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids. *Physiologia Plantarum* 119, 347-35
- Müller, P.; Li, X.-P. und Niyogi, K. K. (2001).** Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiology* 125, 1558-1566
- Niyogi, K. K. (1999).** Photoprotection Revisited: Genetic and Molecular Approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 333-359
- Paulsen, H.; Rümmler, U. und 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. und Hobe, S. (1992).** Pigment-binding properties of mutant light-harvesting chlorophyll-*a/b*-binding protein. *European Journal of Biochemistry* 205, 71-76
- Paulsen, H. und Kuttkat, A. (1993a).** Pigment Complexes of Light-Harvesting Chlorophyll *a/b* Binding Protein are stabilized by a Segment in the Carboxyterminal Hydrophilic Domain of the Protein. *Photochemistry and Photobiology* 57, 139-142
- Paulsen, H.; Finkenzeller, B. und Kühlein, N. (1993).** Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein. *European Journal of Biochemistry* 21, 809-816
- Paulsen, H. (1995).** Review: Chlorophyll *a/b*-binding Proteins. *Photochemistry and Photobiology* 62, 367-382
- Paulsen, H. (1997).** Pigment ligation to proteins of the photosynthetic apparatus in higher plants. *Physiologia Plantarum* 100, 760-768
- Polívka, T.; Herek, J. L.; Zigmantas, D.; Åkerlund, H. E. und Sundström, V. (1999).** Direct observation of the (forbidden) S1 state in carotenoids. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 96, 4914-4917
- Popot, J. L. und Engelman, D. M. (1990).** Membrane Protein Folding and Oligomerization: The Two-Stage Model. *Biochemistry* 29, 4031-4037
- Popot, J. L. und Engelman, D. M. (2000).** Helical membrane protein folding, stability, and evolution. *Annual Review of Biochemistry* 69, 881-922
- Remelli, R.; Varotto, C.; Sardoná, D.; Croce, R. und Bassi, R. (1999).** Chlorophyll Binding to Monomeric Light-harvesting Complex. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 10056-10061
- Reynolds, J. A. und Tanford, C. (1970).** The Gross Conformation of Protein-Sodium Dodecyl Sulfate Complexes. *The Journal of Biological Chemistry* 245, 5161-5165
- Rogl, H. und Kühlbrandt, W. (1999).** Mutant Trimers of Light-Harvesting Complex II Exhibit Altered Pigment Content and Spectroscopic Features. *Biochemistry* 38, 16214-16222
- Rogl, H.; Schödel, R.; Lokstein, H.; Kühlbrandt, W. und Schubert, A. (2002).** Assignment of Spectral Substructures to Pigment-Binding Sites in Higher Plant Light-Harvesting Complex LHC-II. *Biochemistry* 41, 2281-2287

- Rosenberg, A.; Griffin, K.; Studier, F. W.; McCormick, M.; Berg, J.; Novy, R. und Mierendorf, R. (1996).** T7Select Phage Display System: A powerful new protein display system based on bacteriophage T7. *in* *Novations 6*
- Ruban, A. V.; Young, A. J.; Pascal, A. A. und Horton, P. (1994).** The Effects of Illumination on the Xanthophyll Composition of the Photosystem II Light-Harvesting Complexes of Spinach Thylakoid Membranes. *Plant Physiology* 104, 227-234
- Ruban, A.; Lee, P. J.; Wentworh, M.; Young, A. und Horton, P. (1999).** Determination of the Stoichiometry and Strength of Binding of Xanthophylls to the Photosystem II Light Harvesting Complexes. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 10458-10465
- Sanger, F.; Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977).** DNA-sequencing with chain-terminating inhibitores. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 74, 5463-5467
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987).** Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166, 368-379
- Schiffer, C.-H. C. und Stevens, F. J. (1992).** The functions of tryptophan residues in membrane proteins. *Protein Engineering* 5, 213-214
- Schmeil, H. (1992).** Rekonstitution und Charakterisierung von monomeren LHCII-Komplexen mit genetisch veränderten Lichtsammelproteinen. Diplomarbeit an der biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians Universität München
- Shafikhani, S.; Siegel, R. A.; Ferrari, E. und Schellenberger, V. (1997).** Generation of Large Libraries of Random Mutants in *Bacillus subtilis* by PCR-Based Plasmid Multimerization. *BioTechniques* 23, 304-310
- Sieber, V.; Plückthun, A. und Schmid, F. X. (1998).** Selecting proteins with improved stability by a phage-based method. *Nature Biotechnology* 16, 955-960
- Siefermann-Harms, D. und Angerhofer, A. (1998).** Evidence for an O₂-barrier in the light-harvesting chlorophyll-*a/b*-protein complex LHC II. *Photosynthesis Research* 55, 83-94
- Smith, G. P. (1985).** Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the surface of the virion. *Science* 228, 1315-1317
- Sokoloff, A. V.; Bock, I.; Zhang, G.; Sebestyén, M. G. und Wolff, J. A. (2000).** The Interactions of Peptides with the Innate Immune System Studied with Use of T7 Phage Peptide Display. *Molecular Therapy* 2, 131-139
- Son, M.; Hayes, S. J. und Serwer, P. (1988).** Concatemerization and Packaging of Bacteriophage T7 DNA in Vitro; Determination of the Concatemers' Length and Appearance Kinetics by Use of Rotating Gel Electrophoresis. *Virology* 162, 38-46
- Sparks, A. B.; Adey, N. B.; Cwirla, S. und Kay, B. K. (1996).** Screening Phage-Displayed Random Peptide Libraries. In: Kay, Brian K.; Winter, Jill and McCafferty, John (Hrsg.) *Phage Display of Peptides and Proteins. A Laboratory Manual.* (1996) Academic Press, Inc. San Diego, USA
- Steven, A. C. und Trus, B. L. (1986).** The Structure of Bacteriophage T7. *Electron Microscopy of Proteins* 5, 1-35
- Swanson, D. (1999).** The Ties That Bind: Peptide Display Technology. www.the-scientist.com/yr1999/mar
- T7Select Handbuch (1999).** Novagen, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach/Ts.

- Teufel, M.; Pompejus, M.; Humble, B.; Friedrich, K. und Fritz H.-J. (1993).** Properties of bacteriorhodopsin derivatives constructed by insertion of an exogenous epitope into extra-membrane loops. *The EMBO Journal* 12, 3399-3408
- Thayer, S. S. und Björkman, O. (1992).** Carotenoid distribution and de-epoxidation in thylakoid pigment-protein complexes from cotton leaves and bundle-sheath cells of maize. *Photosynthesis Research* 33, 213-225
- Thornber, J. P.; Cogdell, R. J.; Chitnis, P.; Morishige, D. T.; Peter, G. F.; Gomez, S. M.; Anandan, S.; Preiss, S.; Dreyfuss, B. W.; Lee, A.; Takeuchi, T. und Kerfeld, C. (1994).** Antenna pigment protein complexes of higher plants and purple bacteria. *Advances in Molecular and Cell Biology* 10, 55-118
- Van den Burg, B. and Eijsink, V. (2002).** Selection of mutations for increased protein stability. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 333-337
- Vartanian, J.-P.; Henry, M. und Wain-Hobson, S. (1996).** Hypermutagenic PCR involving all four transitions and a sizeable proportion of transversions. *Nucleic Acids Research* 24, 2627-2631
- Vriend, G.; Berendsen, H. J. C.; Van den Burg, B.; Venema, G. und Eijsink, V. G. H. (1998).** Early Steps in the Unfolding of Thermolysin-like Proteases. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 35074-35077
- Walters, R. G.; Ruban, A. V. und Horton, P. (1996).** Identification of proton-active residues in a higher plant light-harvesting complex. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 93, 14204-14209
- Wedel, N.; Klein, R.; Ljungberg, U.; Andrsson, B. and Herrmann, R.G. (1992).** The single copy gene psbS codes for a phylogenetically intriguing 22 kDa polypeptide of photosystem II. *FEBS Letters* 314, 61-66
- White, S. H. und Wimley, W. C. (1999).** Membrane Protein Folding and Stability: Physical Principles. *Annual Review of Biophysics and Biololecular Structure* 28, 319-365
- Yakushevskaya, A. E.; Keegstra, W.; Boekema, E. J.; Dekker, J. P.; Andersson, J.; Jamsson, S.; Ruban, A. V. und Horton, P. (2003).** The Structure of Photosystem II in Arabidopsis: Localization of the CP26 and CP29 Antenna Complexes. *Biochemistry* 42, 608-613
- Yang, C.; Kosemund, K.; Cornet, C. und Paulsen, H. (1999).** Exchange of Pigment-Binding Amino Acids in Light-Harvesting Chlorophyll *a/b* Protein. *Biochemistry* 38, 16205-16213
- Yang, C.; Horn, R. und Paulsen, H. (2003).** The Light-Harvesting Chlorophyll *a/b* Complex Can Be Reconstituted in Vitro from Its Completely Unfolded Apoprotein. *Biochemistry* 42, 4527-4533
- Yang, D.-H.; Webster, J.; Adam, Z.; Lindahl, M. und Andersson, Bertil (1998).** Induction of Acclimative Proteolysis of the Light-Harvesting Chlorophyll *a/b* Protein of Photosystem II in Response to Elevated Light Intensities. *Plant Physiology* 118, 827-834
- Yau, W.-M.; Wimley, W. C.; Gawrisch, K. und White, S. H. (1998).** The Preference of Tryptophan for Membrane Interfaces. *Biochemistry* 37, 14713-14718
- Zhou, Y. und Bowie, J. U. (2000).** Building a Thermostable Membrane Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 6975-6979
- Zolla, L. und Rinalducci, S. (2002).** Involvement of Active Oxygen Species in Degradation of Light-Harvesting Proteins under Light Stresses. *Biochemistry* 2002 41, 14391-14402
- Zozulya, S.; Lioubin, M.; Hill, R. J.; Abram, C. und Gishizky, M. L. (1999).** Mapping signal transduction pathways by phage display. *Nature Biotechnology* 17, 1193-1198

Abkürzungen

(v/v)	volume per volume
(w/v)	weight per volume
¹ Chl*	Chlorophyll im Singulett-Anregungszustand
¹ O ₂ *	Sauerstoff im Singulett-Anregungszustand
³ Chl*	Chlorophyll im Triplett-Anregungszustand
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammonium Peroxid Sulfate
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chlor-3-indolylphosphat Na ₂ -Salz
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
Chl	Chlorophyll
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
CPA	Carboxypeptidase A
ddNTP	Dideoxynukleosidtriphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4 Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
<i>F</i> ₆₈₀ / <i>F</i> ₆₆₀	Verhältnis der Fluoreszenzen von Chl <i>a</i> und Chl <i>b</i> nach Anregung von Chl <i>b</i>
IB	Inclusion Bodies
IPTG	Isopropyl-β,D-Thiogalactosid
kb	Kilobasenpaare
KDS	Kaliumdodecylsulfat
L1/2	Lutein-Bindestelle ½
LB	Luria-Bertani
LDS	Lithium Dodecyl Sulfat
Lhc	Light harvesting complex
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NPQ	Non photochemical quenching
OD	Optische Dichte
OG	Octylglycosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
pfu	Phage forming units
PS	Photosystem
qE	ΔpH-abhängige NPQ-Prozesse
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TBST	TBS-Tween 20
TBSTT	TBS-Tween 20-Triton X-100
TCP	Tricyanoethylphosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLCK	N α-p-tosyl-L-Lysin chloromethylketone
TNT	Tris-NaCl-Tween
TPCK	L-1-Chlor-3-Phenyl-3(p-Toluolsulfonamido)-2-Butanon
U	Unit
UV	Ultraviolett
ΔpH	PH-Gradient

Single Amino Acids in the Luminal Loop Domain Influence the Stability of the Major Light-Harvesting Chlorophyll *a/b* Complex[†]

Vera Mick,[‡] Kristina Eggert,[‡] Bo Heinemann,[§] Sonja Geister,^{||} and Harald Paulsen^{*,‡}

Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, D-55099 Mainz, Germany, Revotar Biopharmaceuticals AG, Neudorfstrasse 24a, 16761 Hennigsdorf, Germany, and Physikalische Biochemie, Universität Potsdam, 14415 Potsdam, Germany

Received December 8, 2003; Revised Manuscript Received March 9, 2004

ABSTRACT: The major light-harvesting complex of photosystem II (LHCIIb) is one of the most abundant integral membrane proteins. It greatly enhances the efficiency of photosynthesis in green plants by binding a large number of accessory pigments that absorb light energy and conduct it toward the photosynthetic reaction centers. Most of these pigments are associated with the three transmembrane and one amphiphilic α helices of the protein. Less is known about the significance of the loop domains connecting the α helices for pigment binding. Therefore, we randomly exchanged single amino acids in the luminal loop domain of the bacterially expressed apoprotein Lhcb1 and then reconstituted the mutant protein with pigments *in vitro*. The resulting collection of mutated recombinant LHCIIb versions was screened by using a 96-well-format plate-based procedure described previously [Heinemann, B., and Paulsen, H. (1999) *Biochemistry* 38, 14088–14093], enabling us to test several thousand mutants for their ability to form stable pigment–protein complexes *in vitro*. At least one-third of the positions in the loop domain turned out to be sensitive targets; i.e., their exchange abolished formation of LHCIIb *in vitro*. This confirms our earlier notion that the LHCIIb loop domains contribute more specifically to complex formation and/or stabilization than by merely connecting the α helices. Among the target sites, glycines and hydrophilic amino acids are more prominently represented than hydrophobic ones. Specifically, the exchange of any of the three acidic amino acids in the luminal loop abolishes reconstitution of stable pigment–protein complexes, suggesting that ionic interactions with other protein domains are important for correct protein folding or complex stabilization. One hydrophobic amino acid, tryptophan in position 97, has been hit repeatedly in independent mutation experiments. From the LHCIIb structure and previous mutational analyses, we propose a stabilizing interaction between this amino acid and F195 near the C-proximal end of the third transmembrane helix.

The major light-harvesting antenna of photosystem II (LHCIIb)¹ is one of the few integral membrane proteins that can be produced in its recombinant form and then refolded *in vitro* (1, 2). This makes it an attractive model for studying the folding and stability of membrane proteins. LHCIIb belongs to the family of chlorophyll (chl) *a/b* proteins and contains chlorophyll *a* and *b* molecules and carotenoids in a structure that efficiently harvests light and transfers its energy to the photosynthetic reaction centers. Electron crystal-

lographic analysis of LHCIIb (3) revealed three transmembrane helical protein domains and a fourth amphiphilic helix located on the luminal membrane surface. These helices ligate most of the chlorophylls and the carotenoids. The first (N-proximal) and the third (C-proximal) transmembrane helices intertwine in a supercoil and are linked to each other by two ion bridges (3). The middle helix makes no direct contact with the other ones but supposedly interacts with them through chlorophyll molecules.

Such helix–helix interactions have been proposed to be a major driving force during folding and assembly of helical membrane proteins. The “two-stage model” of Popot and Engelman (4, 5) views the transmembrane α helices as initially independently folding units that then in a second step converge and assemble. Consistent with this model, the transmembrane helices of bacteriorhodopsin form spontaneously *in vitro*, even in the absence of the retinal chromophore (6). The helices then assemble correctly even when they are no longer covalently linked due to cuts in the loop domains (7–9). An only limited importance of the protein loops is further suggested by the observation that bacteriorhodopsin tolerates various changes in its loop regions (10, 11), including the replacement by structureless GGS-based pep-

[†] This work has been funded in part by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Pa 324/5-3) and Bundesministerium für Bildung und Forschung (Center of Multifunctional Materials and Miniaturized Devices).

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: paulsen@mail.uni-mainz.de. Telephone: 49-6131-3924633. Fax: 49-6131-392-3787.

[‡] Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

[§] Revotar Biopharmaceuticals AG.

^{||} Universität Potsdam.

¹ Abbreviations: bR, bacteriorhodopsin; chl *a/b*, chlorophyll *a/b*; DTT, dithiothreitol; F_{680}/F_{660} , ratio of fluorescence emission intensities at 680 nm to that at 660 nm; LDS, lithium dodecyl sulfate; Lhcb, light-harvesting chlorophyll *a/b* protein of photosystem II; LHCIIb, major light-harvesting complex of photosystem II, containing apoproteins Lhcb1–3; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PCR, polymerase chain reaction; SDS, sodium dodecyl sulfate.

tide linkers (12), although in some cases the construct stabilities were reduced compared to that of the wild type.

The folding and assembly of LHCIIB in vitro do not fit quite as nicely with the two-stage model. In this protein, α helix formation is in part dependent on the presence of pigments (13). Attempts to assemble LHCIIB from fragments of its apoprotein have not been successful; rather, deletions from the protein from the N- or C-terminus by more than 60 or 11 amino acids, respectively, completely abolished formation of the pigment-protein complex, suggesting its highly synergetic stabilization (14–16). In an earlier contribution, we compared the significance of transmembrane helix and loop domains for the folding and stability of LHCIIB in vitro by randomly introducing single-amino acid exchanges and then isolating those protein mutants that could no longer form stable pigment-protein complexes. When the mutations were targeted to the stromal loop and the third transmembrane helix simultaneously, we observed approximately the same number of “lethal” hits abolishing LHCIIB reconstitution in either domain, suggesting that the loop is about as significant for successful LHCIIB assembly as the α helix (17). We identified eight amino acid positions in the stromal loop domain whose exchange caused the failure of LHCIIB reconstitution in vitro.

To obtain a more complete picture of the participation of loop regions in the assembly and stabilization of LHCIIB, we performed a random mutational analysis targeted to the luminal loop, connecting the first and second transmembrane helices. In approximately one-third of the amino acid positions, we have found point mutations that prevented refolding of the apoprotein and/or stable pigment binding, demonstrating the significance of this protein loop domain for the assembly of stable LHCIIB.

MATERIALS AND METHODS

Site-Specific Mutagenesis. An expression construct of the *lhcb1*2* gene “AB80” from pea (18) was used, encoding the mature form of Lhcb1 except amino acids 3 and 4 are lacking [MRATTKKVASS¹¹ (15)]. This construct was modified to introduce a unique *SacI* restriction site near the C-proximal end of helix 1 and a unique *SphI* endonuclease site near the N-terminus of helix 2. To introduce the *SphI* site, directed mutagenesis was performed with sense primer 5'-GCT CAA AGC ATG CTT GCC ATA TGG G-3', introducing the L125M amino acid substitution. This substitution had, however, no effect on reconstitution ability (not shown). The *SacI* restriction site was introduced by utilizing sense primer 5'-CCC AGA GCT CTT GTC TCG C-3', introducing no amino acid substitution. In both cases, antisense primer 5'-TGG ATC AAA GCT TCC ACC TGG GTA AAG TGG-3' was used. The PCR product was used as a “mega antisense primer” in a second PCR according to ref 19 with sense primer 5'-ATT TGC TTT GTG AGC GG-3'. The final PCR product was cloned into the wild-type plasmid, using the *EcoRI* and *BstEII* restriction sites. All primers were purchased from MWG-Biotech (Munich, Germany) and used without further purification. Enzymes and dNTPs were obtained from New England Biolabs (Frankfurt am Main, Germany), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), and Roche (Mannheim, Germany). All constructs were verified by sequencing (Genterprise AG, Mainz, Germany).

Creating a Mutant Library. A mutant library of Lhcb1 was generated as described previously (17). The *lhcb1* fragment defined by sense primer 5'-CGG TGA CTA CGG TTG GG-3' and antisense primer 5'-TGG ATC AAA GCT TCC ACC TGG GTA AAG TGG-3' was amplified by using reduced-fidelity PCR (20–22), generating random mutations throughout the sequence, and ligated into the *SacI* and *SphI* restriction sites of the wild-type *lhcb1* gene. The cloned fragment encoded amino acids between L85 and S123 (numbering according to ref 3).

Screening of Lhcb1 Mutants. A one-vessel procedure for the expression of the Lhcb1 mutants and their reconstitution with pigments on 96-well plates was developed in our previous study (17). As described there in detail, energy transfer from chl *b* to chl *a* was assessed by exciting chl *b* at 480 nm and detecting chl *a* (680 nm) and chl *b* (660 nm) emission, using a Fluoroscan Ascent apparatus (Labsystems, Helsinki, Finland) operated with Ascent version 2.1. A low F_{680}/F_{660} ratio was taken as an indication of an unsuccessful reconstitution.

Screening by Partially Denaturing Gels. From each 96-well plate, the 10 mutant proteins exhibiting the lowest F_{680}/F_{660} ratio were expressed in larger amounts, using the method described in ref 2. Reconstitution was performed by changing the detergent from dodecyl sulfate to octyl glycoside as reported previously (23). The protein concentration was 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, and the total pigment extract from pea leaves (2) was used with a final chlorophyll concentration of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ during reconstitution, determined according to ref 24. The pigment extract contained chl *a* and chl *b* in a 3:1 ratio and xanthophylls (lutein, neoxanthin, and violaxanthin at a 3:1:1 weight ratio) in a molar ratio of 0.2 compared to chlorophylls as determined by HPLC analysis (25). Reconstitution buffer contained 100 mM Tris-HCl (pH 9), 5 mM ϵ -aminocaproic acid, 1 mM benzamidine, 12.5% (w/v) sucrose, and 2% (w/v) lithium dodecyl sulfate. DTT was added after boiling to a final concentration of 1 mM.

Partially denaturing LDS-PAGE (26) was performed as described previously (2) on discontinuous gels with a 1 cm stacking gel [4.5% (w/v) polyacrylamide] and a 10 cm resolving gel (12%), containing 10 and 5% (v/v) glycerol, respectively.

RESULTS

Random Mutagenesis. In our previous work (17), we had simultaneously introduced random mutations in a transmembrane helix and loop domain of Lhcb1 to assess the sensitivity of protein folding and complex stability toward amino acid exchanges in these two types of domains. In this study, we focused on the luminal loop domain of the protein, aiming to obtain a more complete picture of its sensitive amino acid positions.

The target domain for random mutagenesis comprised the entire luminal loop as well as five amino acids of the first and one of the second transmembrane helix. This corresponds to a *SacI*–*SphI* fragment of the Lhcb1 expression plasmid. Following the mutation step, this fragment was religated into the nonmodified expression plasmid to confine the mutagenesis to the target protein section. Random mutagenesis was performed by low-fidelity PCR using biased nucleotide concentrations and Mn^{2+} ions (17, 20). The PCR conditions

Table 1: Mutation Matrix for Mutagenic PCR

	to G	to A	to T	to C
from G		5	1	0
from A	4		16	1
from T	6	13		8
from C	1	2	2	

were optimized to create a maximum number of single-amino acid exchanges in the target domain requiring one or two nucleic acid exchanges due to the ambiguity of the genetic code. To this end, two consecutive rounds of PCRs were performed with the 100-fold diluted product of the first reaction serving as a template for the second one (22). Under the conditions used in this and our previous work (17), the mutation rate was estimated to be ca. 0.6 mutation/100 bp per PCR round, consistent with the mutation rate of 0.49% reported by Shafikhani et al. (22).

In our previous work, we had found that there was a bias toward exchanges of A and T, whereas all four bases were incorporated with approximately the same probability (17). In the study presented here, we again see a strong bias toward mutations in A (30%) and T (50%) positions over G (10%) and C (10%) positions, but the incorporated nucleotides were also somewhat biased toward A (34%) and T (32%) compared to G (19%) and C (15%), rendering the transversion of A to T or vice versa the most frequently observed base exchange (Table 1). This trend has been described before for similar mutageneses with DNA from *Bacillus subtilis* (22).

Screening of the Mutant Library. As described previously (17), a 96-well plate procedure was used to screen mutated proteins, allowing analysis of several thousand mutants at a reasonable effort. Single Lhcb1 expression clones originating from the random mutagenesis reactions were grown in the troughs of 96-well plates. All subsequent steps were performed as single-vessel reactions on the same plate. These steps included growing the bacteria, induction of Lhcb1 expression, lysis of the bacteria, enrichment and solubilization of Lhcb1 inclusion bodies, reconstitution of the protein with chlorophylls and carotenoids to yield monomeric recombinant LHCIIb, and screening for those proteins in which mutations had affected their ability to form stable pigment-protein complexes. This screen was done by fluorescence emission measurements (not shown), taking advantage of the fact that in reconstituted LHCIIb the excitation energy of chl *b* is efficiently transferred to chl *a*. Therefore, upon excitation of chl *b*, significant emission of chl *a* at 680 nm, rather than chl *b* at 660 nm, indicated successful LHCIIb formation. From each 96-well plate, we routinely picked 10 clones exhibiting the lowest F_{680}/F_{660} ratios and subjected these to a second level of screening.

Of all the selected clones, proteins were expressed on a larger scale and subjected to low-stringency detergent-exchange reconstitution (23). The reconstitution products were then analyzed by partially denaturing polyacrylamide electrophoresis (not shown). Similar results were obtained for reconstitutions that were carried out at pH 7 instead of pH 9 in the standard procedure. A total of 4300 mutants were analyzed; of these, 140 gave shortened or no expression products, presumably due to the mutagenic introduction of stop codons, and were disregarded. Thirty-three full-length

Table 2: Induced Amino Acid Substitutions

single mutations (15) ^a	double mutations (10)	triple mutations (3)	quadruple mutations (1)
S86P	L85M/S102F	S86P/E107K/L113M	K91I/E94G/F98Y/L118S
G89S	V90D/W97G	V90A/K91I/I104F	
E94G (2) ^b	V90G/E94V	F98L/Q103L/H120L	
W97R (3) ^b	K91I/W97R		
G101R	W97C/A121G		
S102T	F98Y/Q122L		
E107V	S102P/S123G		
G109R	F105L/L113M		
D111V	L113S/N115K		
G114D	V119A/Q122L		
N115Y			
H120L			
H120Y			
Q122H			
Q122L (2) ^b			

^a Number of mutants found. ^b Number of mutants bearing the same amino acid substitution identified in independent experiments.

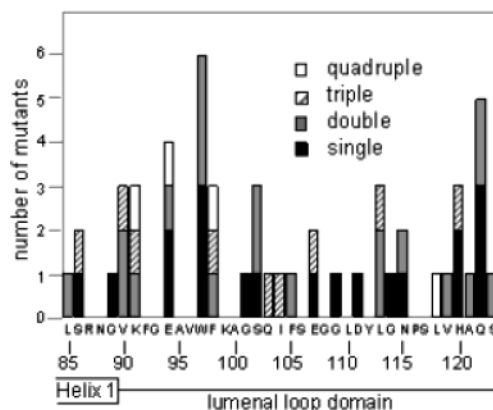


FIGURE 1: For each amino acid in the target domain, the number of hits in independent single or multiple mutations is given. Amino acids and borders of helix and loop domains are numbered according to that in ref 3.

Table 3: Character of Amino Acids Hit as Single Mutations

	hydrophobic	polar	acidic	basic	glycine
no. of occurrences in sequence	16	11	3	3	6
no. of single hits	1	5	3	0	4
% hits	6	45	100	0	67

Lhcb1 mutants showed no reconstitution in three independent experiments. The DNA encoding the target domains of these mutants was sequenced to identify the amino acid exchanges; the result is shown in Table 2. Figure 1 shows where the amino acid exchanges are located in the target domain. In addition to 15 different single-amino acid exchanges, 10 double, 3 triple, and 1 quadruple mutations were found. In the case of multiple hits, it is impossible in most cases to tell which amino acid exchange is responsible for the inhibition of pigment-protein complex formation; therefore, only the single-amino acid exchanges were further analyzed. Table 3 summarizes the frequency at which different types of amino acids have been hit by single-amino acid exchanges. The relative frequency is high for acidic and polar amino acids and glycine and low for hydrophobic and basic amino acids.

DISCUSSION

Distribution of Single-Amino Acid Exchanges Influencing the Stability of LHCIIB. Single-amino acid exchanges reducing the stability of LHCIIB are found nearly equally distributed over the entire mutated sequence with no obvious hot-spot regions (Figure 1). Approximately 30% of the residues in the loop domain have been hit as single mutations, confirming our earlier finding that the loop domains are sensitive toward amino acid exchanges that reduce complex stability. In the electron crystallographic analysis of the LHCIIB structure (3), the section between amino acids A100 and P116 was not resolved, indicating a higher mobility or otherwise less defined structure. We have no indication of a lower sensitivity of this loop section toward mutations and conclude that it contributes as much to LHCIIB formation or stability as the rest of the luminal loop domain.

In the study by Zhou et al. (27), the edges of transmembrane helices turned out to be sensitive targets for enhancing the stability of diacylglycerol kinase, an integral membrane protein of *Escherichia coli*, rendering these regions potential targets for destabilizing exchanges as well. Two of the four amino acids defining the edges of the two transmembrane helices have been hit in single mutations in this study (Figure 1); however, the neighboring amino acids have not, and when the density of hits over the entire loop is considered, no marked sensitivity is seen at the transitions between helix and loop structures.

The loop domains of Lhc proteins show a much lower degree of sequence conservation than the transmembrane helices (28), particularly when different members of the Lhca and Lhcb protein families are compared. Only the apoproteins of the major trimeric LHCIIB, Lhcb1 and Lhcb2 and, to a lesser extent, Lhcb3, exhibit more extensive similarity in their loop regions. When the loop regions of individual Lhcb proteins are compared between different higher-plant species, they are almost identical (29, 30). The only segment of the luminal loop that is conserved throughout the Chl *a/b* family is the W₉₇FXAG₁₀₁ motif (31).

The conserved W₉₇FXAG₁₀₁ motif is thought to bind the pigment cluster of chl *a*₆, chl *a*₇, and one lutein headgroup (32). Thus, mutations in this region may have an impact on pigment binding. In our mutational analysis, the W and G of the WFXAG motif have been hit (for W₉₇, see below) whereas F and A are not found among the sensitive positions, or they show up in only multiple mutations. If the WFXAG motif is particularly significant for pigment binding or complex stabilization, then our analysis suggests that, with regard to the stability of monomeric pigment–protein complexes of Lhcb1, the rest of the luminal loop is about as important.

Limitations of the Mutational Analysis. It should be kept in mind that our mutations could not replace each amino acid with any other amino acid. Our mutational rate only allowed for single nucleotide exchanges within each codon. Because of the degeneracy of the genetic code, five to eight of the nine possible nucleotide exchanges (six on average) led to a different amino acid. However, this is only a partial limitation, as glycine, possessing a highly degenerate code, nevertheless turned out to be a particularly frequent target (see below). The bias in nucleotide exchange (Table 1) further limited the probability of certain amino acid ex-

changes. G and C positions are less frequently mutated than A and T positions; consequently, codons containing G and C exclusively are 4-fold less likely to be altered than A- and T-containing codons. Again, this is a partial limitation only, as G114 with a purely G- and C-containing codon is among the singular hits in our study.

We have not been able to carry our mutational analysis into saturation, although we have analyzed a much larger number of mutants in this study than in our previous one (17). Saturation would be reached when all single-amino acid exchanges appear in more than one independent round of mutation and selection. In the study presented here, this is only true for four of 13 single hits. We would have needed many more rounds of mutation to repeat all single hits, due to the unexpectedly high number of single-amino acid exchanges in the luminal loop domain that abolish formation of the pigment–protein complex under our reconstitution conditions. Therefore, the observed 30% of sensitive amino acid positions must be considered a lower estimate; it is highly likely that a larger number of random mutations would reveal an even larger percentage of amino acid positions that have an impact on LHCIIB formation or stability.

Destabilizing Amino Acid Exchanges. The amino acid exchanges were not clustered in any section of the luminal loop domain; on the other hand, the distribution of hit amino acids was far from random with regard to the character of the exchanged amino acids. With the exception of one hydrophobic residue, only polar, acidic, and glycine amino acids were hit in single mutations.

The acidic residues, all of which were exchanged, appeared to be a particularly sensitive target in this mutational study (Table 3). All three acidic residues were substituted with small apolar residues (G and V), although in every case substitution with the other acidic residue could have been reached by two different single-nucleotide exchanges. Of course, we cannot exclude the possibility that the significance of these mutations is in the decrease in size or polarity. However, the astonishingly different mutation frequency of acidic versus basic amino acids (three of three vs zero of three) suggests that it is the loss of negative charge that abolishes the ability of the protein to form stable pigment complexes. By contrast, the loss of positive charge does not appear to have an impact. If we look at the charges introduced by the amino acid exchanges, we see the opposite trend: three mutants that no longer reconstitute carry an additional positive charge but only one carries an extra negative charge.

If there is in fact a correlation between added positive net charge in the luminal loop and LHCIIB destabilization, this may have a regulatory function. When thylakoids are highly energized, the lumen pH drops to values of ~5. The low lumen pH then activates violaxanthin deepoxidase, triggering the formation of zeaxanthin in the xanthophyll cycle. This in turn dissipates excess excitation energy that resides in the light-harvesting system and helps to avoid photooxidative damage due to overexcitation (33–37). Regardless of whether the deepoxidase gains access to an LHCIIB-bound violaxanthin or the pigment needs to dissociate from the complex before being converted (38, 39), a relatively loose structure of the pigment–protein complex is needed on its luminal surface before violaxanthin deepoxidation is to take place. This could be brought about by a pH-regulated

structural reorientation of the luminal loop. In fully energized thylakoids, at least part of the D and E side chains in the luminal loop of LHCIIb become protonated and, thus, lose their negative charge. This may lead to a partial detachment of the luminal loop from the rest of LHCIIb if the acidic side chains at neutral pH form salt bridges with basic amino acids. According to the LHCIIb crystal structure, an interaction is possible between E94 and K203 in the loop between helix 3 and the amphiphilic helix. In fact, for bR the cross bracing of loop domains via salt bridges has been suggested to be a prerequisite for properly positioning the adjacent transmembrane helices (40). The position of E107 and D111 in the LHCIIb crystal structure is not well-resolved (3), but independent of their exact position, the nearest basic amino acid is K91, located in the luminal loop domain. K91 was hit in three multiple mutation events but never as a single mutation, suggesting but not proving its participation in the stabilization of LHCIIb. Besides salt bridges, acidic amino acids may be involved in H-bond interactions with polar amino acids, and these interactions may be regulated by pH as well. It would be conceivable that the lack of such interactions of the luminal loop domain also lowers the overall stability of LHCIIb or interferes with the folding of its apoprotein. Therefore, we propose that mutations decreasing the net negative charge of the luminal loop mimic the situation in energized thylakoids where negatively charged side chains become protonated causing the loop to adopt a less compact structure and that this explains the failure of these mutants to form stable LHCIIb *in vitro*. This conjecture can be tested by more structurally conservative exchanges of D and E residues in the stromal loop with N and Q, respectively. The prediction is that these also lead to LHCIIb destabilization.

The notion of negative charges potentially playing a significant role in the luminal loop domain is supported by sequence data of Lhcb1–3 proteins in *Arabidopsis* (30). Although differences between Lhcb1- and -2 and Lhcb3 include charged amino acids, the net charge of the luminal loop domain in Lhcb3 is -1 , as in Lhcb1 and -2, and the acidic amino acids of Lhcb1 and -2 are conserved in Lhcb3.

The hydrophobic amino acids, constituting $\sim 40\%$ of the amino acids in the target domain, are clearly underrepresented by only one residue (W97) among the amino acids hit in single-mutation events (Table 3). In our previous study (17), two deleterious exchanges of hydrophobic amino acids were observed in the stromal loop domain, one L to P exchange and one P to L exchange. In either case, the hydrophobicity was conserved but P was involved, an amino acid known to introduce kinks into the polypeptide backbone and, thus, likely to change the overall structure of a domain. We conclude that hydrophobic amino acids, although abundant in LHCIIb loop domains, do not significantly add to complex stability.

The only hydrophobic residue, W97, that in our mutational study is shown to be important for LHCIIb stability stands out in that it has been hit in three independent mutagenesis events. This W is conserved in most chl *a/b* proteins (31). In membrane proteins, tryptophans are frequently found near the membrane surfaces and seem to prefer the hydrated interface rather than the hydrophobic core of the bilayer (41). For the photosynthetic reaction center of purple bacteria, Schiffer et al. (42) reported that tryptophan residues can link

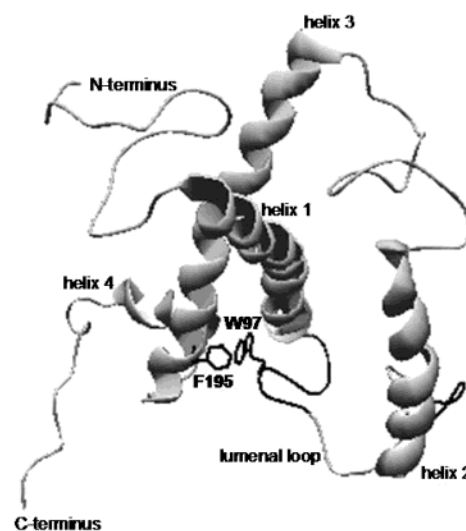


FIGURE 2: Relative positions of W97 and F195 in the three-dimensional backbone structure of LHCIIb (W. Kühlbrandt, personal communication). Side chains of W97 and F195 and the structurally resolved parts of the luminal loop domain are highlighted in black. The three-dimensional structure was displayed by Deep View/Swiss Pdb Viewer version 3.7 (www.expasy.org/spdbv).

distant chain segments. Structural data (3) indicate a linking function for W97 as well, as the luminal loop appears to be pulled into the membrane by this residue that comes into the proximity of F195 at the distal end of helix 3 (Figure 2). The distance between the centers of the aromatic rings could not be determined exactly but is likely to be in the range of 4–6 Å, allowing aromatic interaction which is also favored by the edge-to-face orientation of the residues (43). This interaction, providing a linkage of the luminal loop and helix 3, may be essential for LHCIIb stability. F195 is conserved in most chl *a/b* proteins as well (31), and it was hit three times in our previous study, although in multiple mutants exclusively (17). Interestingly, in progressing *exo* deletions from the C-terminus of recombinant LHCIIb apoprotein, it was a W, too, in position 222 whose loss caused destabilization of the complex (15). Point mutation of W222 to H or G, although it did not affect pigment binding, abolished formation of trimeric complexes, whereas replacement with F restored trimerization (15). In the study presented here, W97 has been replaced with R in three single mutants. According to the point presented above, the loss of pigment–protein complex formation in this case can also be due to introduction of an extra positive charge. To confirm the significance of W97, we need to exchange it with noncharged amino acids.

Roughly half of the polar amino acids have been hit as single mutations, making them a more sensitive target for destabilizing mutations than hydrophobic amino acids. There is no apparent preference for polar residues with certain functional groups such as hydroxyl or amide groups. A striking example for the dependence of LHCIIb stability on the correct polar amino acids in its luminal loop is the apparently rather conservative S102T exchange. The repositioning of the hydroxyl group may be sufficient to abolish stable LHCIIb formation.

Glycines also turned out to be rather frequent targets for destabilizing mutations, as four of six glycine residues have been hit in single-mutation events (Table 3). Glycine, as the

smallest amino acid, can be counted among neither the polar nor the hydrophobic amino acids; it is known to provide local flexibility to polypeptides. Two of the G residues have been replaced with amino acids carrying positive charges, which in these cases may have affected LHCIIB formation (see above).

Taken together, these observations confirm and extend our previous notion that the loop domains in LHCIIB have a more structurally specific impact on the formation and/or stabilization of LHCIIB than merely serving as passive connectors of the α -helical transmembrane domains. If the latter was the case, we would not expect single-amino acid exchanges in every third position to disable the protein to form a stable complex with pigments. Probably even more than one-third of the amino acid positions are sensitive ones because our mutation analysis was not extended into saturation. The larger number of destabilizing amino acid exchanges analyzed in this work compared to our previous one (17) allows us to draw some conclusions about the nature of intramolecular interactions undergone by the luminal loop. The highest frequency of mutational hits abolishing LHCIIB reconstitution was among hydrophilic amino acids, specifically acidic ones, pointing to stabilizing electrostatic or H-bond interactions. These interactions may not only be important for LHCIIB stability but also play a role in regulatory functions of LHCIIB such as the xanthophyll cycle in which the luminal loop may be involved. Possibilities for such interactions like the ones between E107 or D111 and K91 will be tested by site-specific exchanges in these positions and then testing the impact of these mutations on complex stability or functional properties such as conversion of violaxanthin to zeaxanthin.

Since we characterized our mutants simply by measuring the yield of the pigment-protein complex in the reconstitution assay, we cannot tell whether non-reconstituting mutants failed to form pigment-protein complexes at all, due to inhibition of the folding process, or whether the mutants folded in a wild-type-like process, but produced insufficiently stable complexes. Studies with bR constructs with single-loop domains replaced with linkers of GGS repeats indicated a participation of some of the loop domains in both the folding and stability of bR (12, 40). Time-resolved measurements of pigment-protein complex assembly with the protein mutants will be needed to test whether structural alterations in the luminal loop domain of LHCIIB also affect protein folding. The question of whether some of the mutants assemble into complexes with reduced stabilities will be the subject of further studies.

Little is known so far about proteins or other molecules interacting with the luminal surface of LHCIIB. These probably include violaxanthin epoxidase (see above), but there may be more, so far unidentified components of the lumen that bind to LHCIIB. Clearly, our approach cannot be expected to identify such interactions at the luminal loop of the Lhcb1 complex since we screened our random mutants only for their ability to form stable pigment-protein complexes and not for other functions. However, our observation that hydrophilic and in particular acidic amino acids are essential for Lhcb1 folding and/or pigment binding indicates that interactions of the loop domain with other sections of the protein are involved in these processes. If charges are involved in stabilizing interactions of the luminal

loop, this would open up the possibility, as outlined above, of a pH-dependent destabilization, facilitating violaxanthin conversion or antenna degradation at an acidic pH. Testing this hypothesis in vivo will require transgenic plants having their endogenous Lhcb1 and -2 suppressed by antisense RNA (44) and expressing one of the mutant Lhcb1 versions instead.

REFERENCES

1. Plumley, F. G., and Schmidt, G. W. (1987) Reconstitution of chlorophyll *a/b* light-harvesting complexes: Xanthophyll-dependent assembly and energy transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 146–150.
2. Paulsen, H., Rümmler, U., and Rüdiger, W. (1990) Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein overexpressed in *Escherichia coli*, *Planta* **181**, 204–211.
3. Kühlbrandt, W., Wang, D. N., and Fujiyoshi, Y. (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography, *Nature* **367**, 614–621.
4. Popot, J. L., and Engelman, D. M. (1990) Membrane protein folding and oligomerization: The two-stage model, *Biochemistry* **29**, 4031–4037.
5. Popot, J. L., and Engelman, D. M. (2000) Helical membrane protein folding, stability, and evolution, *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 881–922.
6. Booth, P. J., Flitsch, S. L., Stern, L. J., Greenhalgh, D. H., Kim, P. S., and Khorana, H. G. (1995) Intermediates in the folding of the membrane protein bacteriorhodopsin, *Struct. Biol.* **2**, 139–143.
7. Liao, M. J., London, E., and Khorana, H. G. (1983) Regeneration of the native bacteriorhodopsin structure from two chymotryptic fragments, *J. Biol. Chem.* **258**, 9949–9955.
8. Kahn, T. W., and Engelman, D. M. (1992) Bacteriorhodopsin can be refolded from two independently stable transmembrane helices and the complementary five-helix fragment, *Biochemistry* **31**, 6144–6151.
9. Marti, T. (1998) Refolding of bacteriorhodopsin from expressed polypeptide fragments, *J. Biol. Chem.* **273**, 9312–9322.
10. Gilles-Gonzalez, M. A., Engelman, D. M., and Khorana, H. G. (1991) Structure-function studies of bacteriorhodopsin XV, *J. Biol. Chem.* **266**, 8545–8550.
11. Teufel, M., Pompejus, M., Humbel, B., Friedrich, K., and Fritz, H. J. (1993) Properties of bacteriorhodopsin derivatives constructed by insertion of an exogenous epitope into extra-membrane loops, *EMBO J.* **12**, 3399–3408.
12. Kim, J.-M., Booth, P. J., and Allen, S. J. (2001) Structure and function in bacteriorhodopsin: The role of the interhelical loops in the folding and stability of bacteriorhodopsin, *J. Mol. Biol.* **308**, 409–422.
13. Horn, R., and Paulsen, H. (2002) Folding in vitro of light-harvesting chlorophyll *a/b* protein is coupled with pigment binding, *J. Mol. Biol.* **318**, 547–556.
14. Cammarata, K. V., and Schmidt, G. W. (1992) In vitro reconstitution of a light-harvesting gene product: Deletion mutagenesis and analysis of pigment binding, *Biochemistry* **31**, 2779–2789.
15. Paulsen, H., and Hobe, S. (1992) Pigment-binding properties of mutant light-harvesting chlorophyll-*a/b*-binding protein, *Eur. J. Biochem.* **205**, 71–76.
16. Paulsen, H., and Kuttkat, A. (1993) Pigment complexes of light-harvesting chlorophyll *a/b* binding protein are stabilized by a segment in the carboxyterminal hydrophilic domain of the protein, *Photochem. Photobiol.* **57**, 139–142.
17. Heinemann, B., and Paulsen, H. (1999) Random mutations directed to transmembrane and loop domains of the light-harvesting chlorophyll *a/b* protein: Impact on pigment binding, *Biochemistry* **38**, 14088–14093.
18. Cashmore, A. R. (1984) Structure and expression of a pea nuclear gene encoding a chlorophyll *a/b*-binding polypeptide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 2960–2964.
19. Chen, B., and Przybyla, A. E. (1994) An efficient site-directed mutagenesis method based on PCR, *BioTechniques* **17**, 657–659.
20. Cadwell, C. R., and Joyce, G. F. (1992) Randomization of genes by PCR mutagenesis, *PCR Methods Appl.* **2**, 28–33.

21. Vartanian, J.-P., Henry, M., and Wain-Hobson, S. (1996) Hypermutagenic PCR involving all four transitions and a sizeable proportion of transversions, *Nucleic Acids Res.* **24**, 2627–2631.
22. Shafikhani, S., Siegel, R. A., Ferrari, E., and Schellenberger, V. (1997) Generation of large libraries of random mutants in *Bacillus subtilis* by PCR-based plasmid multimerization, *BioTechniques* **23**, 304–310.
23. Paulsen, H., Finkenzeller, B., and Kühlein, N. (1993) Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein, *Eur. J. Biochem.* **215**, 809–816.
24. Porra, R. J., Thompson, W. A., and 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. Biophys. Acta* **975**, 384–394.
25. Hobe, S., Niemeier, H., Bender, A., and Paulsen, H. (2000) Caotenoid binding sites in LHCIIB, *Eur. J. Biochem.* **267**, 616–624.
26. Delepelaire, P., and Chua, N. H. (1981) Electrophoretic purification of chlorophyll *a/b* protein complexes from *Chlamydomonas reinhardtii* and spinach and analysis of their polypeptides, *J. Biol. Chem.* **256**, 9300–9307.
27. Zhou, Y., and Bowie, J. U. (2000) Building a thermostable membrane protein, *J. Biol. Chem.* **275**, 6975–6979.
28. Green, B. R., and Durnford, D. G. (1996) The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **47**, 685–714.
29. Jansson, S. (1994) Review: The light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding proteins, *Biochim. Biophys. Acta* **1184**, 1–19.
30. Jansson, S. (1999) A guide to the Lhc genes and their relatives in *Arabidopsis*, *Trends Plant Sci.* **4**, 236–240.
31. Green, B. R., and 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, *Photosynth. Res.* **39**, 149–162.
32. Green, B. R., and Kühlbrandt, W. (1995) Sequence conservation of light-harvesting and stress-response proteins in relation to the three-dimensional molecular structure of LHCIIB, *Photosynth. Res.* **44**, 139–148.
33. Horton, P., Ruban, A. V., and Walters, R. G. (1994) Regulation of light harvesting in green plants: Indication by nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence, *Plant Physiol.* **106**, 415–420.
34. Horton, P., Ruban, A. V., and Walters, R. G. (1996) Regulation of light harvesting in green plants, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **47**, 655–684.
35. Niyogi, K. K. (1999) Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **50**, 333–359.
36. Müller, P., Li, X. P., and Niyogi, K. K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy, *Plant Physiol.* **125**, 1558–1566.
37. Morosinotto, T., Caffarri, S., Dall'Osto, L., and Bassi, R. (2003) Mechanistic aspects of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids, *Physiol. Plant.* **119**, 347–354.
38. Jahns, P., Wehner, A., Paulsen, H., and Hobe, S. (2001) Depoxidation of violaxanthin after reconstitution into different carotenoid binding sites of light-harvesting complex II, *J. Biol. Chem.* **276**, 22154–22159.
39. Morosinotto, T., Baronio, R., and Bassi, R. (2002) Dynamics of chromophore binding to Lhc proteins in vivo and in vitro during operation of the xanthophyll cycle, *J. Biol. Chem.* **277**, 36913–36920.
40. Allen, S. J., Kim, J. M., Khorana, H. G., Lu, H., and Booth, P. J. (2001) Structure and function in bacteriorhodopsin: The effect of the interhelical loops on the protein folding kinetics, *J. Mol. Biol.* **308**, 423–435.
41. Yau, W. M., Wimley, W. C., Gawrisch, K., and White, S. H. (1998) The preference of tryptophan for membrane interfaces, *Biochemistry* **37**, 14713–14718.
42. Schiffer, M., Chang, C. H., and Stevens, F. J. (1992) The functions of tryptophan residues in membrane proteins, *Protein Eng.* **5**, 213–214.
43. Burley, S. K., and Petsko, G. A. (1986) Dimerization energetics of benzene and aromatic amino acid side chains, *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 7995–8001.
44. Ruban, A. V., Wentworth, M., Yakushevskaya, A. E., Andersson, J., Lee, P. J., Keegstra, W., Dekker, J. P., Boekema, E. J., Jansson, S., and Horton, P. (2003) Plants lacking the main light-harvesting complex retain photosystem II macro-organization, *Nature* **421**, 648–652.

BI036198S

Abstract

LHCIIb, das Hauptlichtsammelprotein des Photosystems II, ist eines der am besten untersuchten Membranproteine. Die Frage, wie die Struktur des Pigment-bindenden Proteins stabilisiert wird, konnte bisher allerdings noch nicht geklärt werden. Im Gegensatz zu anderen Membranproteinen sind im Falle des LHCIIb auch Bereiche außerhalb der Membran an der Stabilisierung beteiligt.

Der Beitrag der luminalen Schleifendomäne zur Stabilisierung des LHCIIb wurde untersucht, indem Mutanten mit einzelnen Aminosäureaustauschen in diesem Bereich bezüglich ihrer Stabilität verglichen wurden. Die luminal Schleife trägt zur thermischen Stabilität des LHCIIb bei und stabilisiert den Pigment-Protein-Komplex in Gegenwart von SDS, wobei verschiedene Mutationen diese beiden Aspekte der Stabilisierung in unterschiedlichem Maße beeinflussen.

Ein weiteres Ziel der Dissertation war die Entwicklung eines evolutiven Verfahrens zur Stabilitätsverbesserung des LHCIIb. Mithilfe eines geeigneten Selektionskriteriums sollten stabile Mutanten des LHCIIb aus einer Bibliothek von Zufallsmutanten selektiert werden. Dazu wurde das Lhcb1-Protein als Phage-Display exprimiert und auf der Bakteriophagenoberfläche rekonstituiert. Verschiedene Eigenschaften des Pigment-Protein-Komplexes wurden als mögliche Selektionskriterien in Betracht gezogen und getestet. Das Selektionsverfahren, stabile Mutanten durch proteolytische Degradation ungefalteter Proteine zu isolieren, erwies sich schließlich als erfolgreich.

Abstract

LHCIIb, the major light-harvesting complex of Photosystem II, is one of the most investigated membrane proteins. Nevertheless, the question of how the structure of this pigment-binding protein is stabilized has so far not been solved. In contrast to other membrane proteins, LHCIIb-domains protruding from the membrane bilayer contribute to complex stability.

The contribution of the luminal loop of LHCIIb was studied by comparing the stability of mutants, bearing single amino acid exchanges in this part of the protein. The luminal loop domain of LHCIIb contributes to thermal stability as well as to stability in the presence of SDS, although the various mutations influence these two aspects of stabilization differentially. Another aim of the work was to develop an evolutionary approach to construct LHCIIb mutants with improved stabilities, including random mutations and subsequent selection. To this end, Lhcb1 was expressed in a phage-display system and reconstituted with pigments on the bacteriophage coat. Different properties of pigment-protein-complexes were tested as possible criteria for selection. Selection of stabilized mutants by proteolytic degradation of unfolded proteins was shown to be successful.