

Untersuchung der Pigment- und Proteinzusammensetzung der peripheren Lichtsammelantenne des Photosystem I

Dissertation zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Stefanie Storf
geboren am 02.10.1974 in Trier, Deutschland

Mainz, 2005

Dekan:
1. Berichtersteller:
2. Berichtersteller:

Tag der mündlichen Prüfung: 17.03.2005

ES WERDE LICHT!

INHALTSVERZEICHNIS

A	EINLEITUNG	1
1.	Der Photosyntheseapparat	1
2.	Aufbau des PSI-LHCI-Holokomplexes	2
2.1	PSI-Kern-Komplex	3
2.2	Die Lichtsammelantenne des PSI	4
2.2.1	Proteinzusammensetzung des LHCI	5
2.2.2	Gene der LHCI-Proteine in <i>Arabidopsis</i> und Tomate	6
2.2.3	Assoziation des LHCI mit dem PSI-Kern	7
2.3	Variation der Größe und Proteinzusammensetzung der PSI-Antenne	8
3.	Lichtsammelproteine	9
3.1	Struktur von Lichtsammelkomplexen	10
3.2	Pigmentbindung der Lhc-Proteine	12
3.3	Schutz des Photosyntheseapparates vor zu hohen Lichtintensitäten	14
3.4	Spektroskopische Eigenschaften des LHCI	16
4.	Fragestellung	17
B	MATERIAL	19
1.	Chemikalien	19
2.	Geräte	19
3.	Computerprogramme und Datenbanken	21
4.	Bakterienstamm und Expressionsplasmide	21
5.	Pflanzenanzucht	22
C	METHODEN	23
1.	Isolierung nativer Pigment-Protein-Komplexe	23
1.1	Thylakoidisolierung	23
1.2	PSI-Isolierung	23
1.3	LHCI-Isolierung	24
1.4	Bestimmung der Pigment/Protein-Stöchiometrie nativer LHCI-Subfraktionen	24
2.	Herstellung rekonstituierter Lichtsammelkomplexe	25
2.1	Zur Rekonstitution verwendete Pigmentmischungen	25
2.2	Herstellung von <i>lhca5</i> -Expressionsplasmiden	25
2.2.1	Bakterienanzucht	26
2.2.2	Herstellung von Dauerkulturen	26
2.2.3	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	26
2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion	27

2.2.5	DNA-Aufreinigung	29
2.2.5.1	Isopropanolfällung	29
2.2.5.2	Gelelution	29
2.2.6	Restriktionsverdau	29
2.2.7	Ligation	30
2.2.8	Transformation	30
2.2.9	Plasmidisolierung	30
2.2.10	DNA-Quantifizierung	30
2.2.11	DNA-Sequenzierung	31
2.3	Proteinüberexpression und „Inclusion Body“-Isolierung	32
2.4	Rekonstitution rekombinanter Lhca-Proteine	33
2.5	Dichtegradienten-Ultrazentrifugation rekonstituierter Lichtsammelkomplexe	34
3.	Biochemische und spektroskopische Charakterisierungsmethoden.....	34
3.1	Photometrische Chlorophyllbestimmung	34
3.2	Tieftemperatur-Fluoreszenzmessungen	34
3.3	Pigmentanalysen per HPLC.....	35
3.4	Proteinquantifizierungen	36
3.4.1	Biorad-Assay für Inclusion Body Präparationen.....	36
3.4.2	BCA-Assay für native Lichtsammelkomplexe.....	36
3.5	Polyacrylamid-Gelelektrophoresen	36
3.5.1	Eindimensionale Gelelektrophoresen	37
3.5.1.1	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
3.5.1.2	Schwach denaturierende LDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	39
3.5.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese	39
3.5.2.1	Probenvorbereitung	40
3.5.2.2	Erste Dimension (Isoelektrische Fokussierung)	40
3.5.2.3	Zweite Dimension (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese).....	41
3.6	Proteinnachweismethoden	41
3.6.1	Proteinfärbungen im Gel	42
3.6.1.1	Coomassie-Färbung	42
3.6.1.2	Silberfärbung	42
3.6.1.3	Phosphoproteinnachweis	42
3.6.2	Westernblot	43
3.6.2.1	Elektrotransfer	43
3.6.2.2	Ponceau S-Färbung	43
3.6.2.3	Proteindetektion mit Antikörpern.....	43
3.6.3	Massenspektrometrische Verfahren	45
3.6.3.1	Elektrospray-Ionisierungs-Tandem-Massenspektrometrie	47
3.6.3.2	Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie	49
3.7	Deepoxidation nativer und rekombinanter Lichtsammelkomplexe	49
3.7.1	Isolation der Violaxanthin-Deepoxidase	49
3.7.2	<i>In vitro</i> -Deepoxidation	49
3.7.3	<i>In vivo</i> -Deepoxidation	50
D	ERGEBNISSE	51
1.	Charakterisierung nativer LHCI-Subfraktionen	51
1.1	Isolierung und Identifizierung nativer LHCI-Subfraktionen	51

1.2	Pigmentzusammensetzung der nativen LHCI-Fraktionen LHCI-730 und LHCI-680	52
2.	Deepoxidation nativer und rekonstituierter Pigment-Protein-Komplexe	53
2.1	Rekonstitution von Lichtsammelkomplexen mit Lutein und Violaxanthin als einzigen Carotinoiden	54
2.2	<i>In vitro</i> -Deepoxidation	55
2.2.1	Deepoxidationskinetiken von Pigment-Protein-Komplexen	55
2.2.2	Vergleich der Pigmentzusammensetzung vor und nach der Deepoxidation	58
2.3	<i>In vivo</i> -Deepoxidation	60
3.	Versuche zur Dimerisierung von Lhca2 und Lhca3.....	60
3.1	Gemeinsame Rekonstitution von Lhca2 und Lhca3 und in Kombination mit Lhca1 und Lhca4	61
3.2	Einfluß von Lipiden auf die Dimerisierung von Lhca2 und Lhca3	62
3.3	Einfluß von zweiwertigen Kationen auf die Dimerisierung von Lhca2 und Lhca3.....	64
4.	Untersuchungen zur Proteinzusammensetzung des LHCI.....	65
4.1	Auftrennung von Tomaten-PSI in eindimensionalen Polyacrylamidgelen.....	66
4.1.1	Verbesserung der Auftrennung von PSI-Untereinheiten in Polyacrylamidgelen	66
4.1.2	Untersuchung der PSI-Proteinzusammensetzung durch Detektion mit Lhca-Antikörpern	67
4.1.3	Massenspektrometrische Untersuchung der Proteinzusammensetzung des Photosystem I nach Auftrennung in eindimensionalen Gelen.....	68
4.1.4	Identifikation neuer LHCI-Proteine durch Massenspektrometrie	70
4.1.4.1	Ein Lhca5-Homolog in Tomate	70
4.1.4.2	Cab12 – eine zweite Isoform des Lhca4.....	71
4.2	Auftrennung von LHCI-Proteinen aus Tomate per zweidimensionaler Gelelektrophorese	72
4.2.1	Identifizierung der durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennten LHCI-Proteine.....	73
4.2.2	Untersuchung des Phosphorylierungszustandes von PSI-Untereinheiten	75
4.2.3	Massenspektrometrische Untersuchung der Proteinzusammensetzung der per 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten LHCI-Proteinspots.....	75
4.2.4	2D-Karte des LHCI – Zusammenfassung der Ergebnisse aus Immunodetektion und Massenspektrometrie.....	77
4.3	Massenspektrometrische Größenbestimmung von LHCI-Proteinen	78
5.	Charakterisierung eines neuen LHCI-Proteins (Lhca5).....	79
5.1	Überexpression rekombinanter Lhca5-Apoproteine	79
5.1.1	Tomaten-Proteine	80
5.1.2	<i>Arabidopsis</i> -Proteine	81
5.2	Rekonstitution eines funktionellen LHC aus rekombinantem Lhca5-Apoprotein.....	82
5.3	Pigmentzusammensetzung des rekonstituierten Lhca5	84
5.4	Pigmentbedarf von Lhca5 zur Bildung stabiler Pigment-Protein-Komplexe	84
5.5	Oligomerisierungsverhalten von Lhca5.....	85
5.5.1	Fluoreszenzeigenschaften des Lhca1/Lhca5-Dimers	87
E	DISKUSSION.....	89
1.	Pigmentbindung von LHCI-Proteinen	89
1.1	Vergleich der Pigmentzusammensetzung nativer Lichtsammelkomplexe.....	89
1.2	Vergleich der Pigmentbindung nativer LHCI-Subfraktionen mit der rekonstituierten Lhca-Proteine.....	91
1.3	Deepoxidation von LHCI-Proteinen	95
2.	Die Proteinzusammensetzung des LHCI ist heterogener als bisher angenommen.....	98

2.1	Woher rührt die Spotvielfalt in zweidimensionalen Gelen?	100
2.2	Der LHCI von Tomate enthält zusätzliche Lhca-Apoproteine	103
3.	Lhca5 - ein zusätzliches LHCI-Protein.....	103
3.1	Wo beginnt das mature Lhca5-Apoprotein?	104
3.2	Lhca5 ist ein funktionelles Lichtsammelprotein	105
4.	Oligomerisierungsverhalten von LHCI-Proteine	108
4.1	Lhca5 interagiert mit Lhca1	108
4.2	Bilden Lhca2 und Lhca3 Dimere?	109
5.	Bedeutung der beobachteten Lhca-Proteinvielfalt für die Struktur und Funktion des PSI-LHCI-Holokomplexes.....	111
F	ZUSAMMENFASSUNG.....	115
G	LITERATUR.....	117
ANHANG.....	127
Nucleotid- und Aminosäuresequenzen.....	127
<i>Lycopersicon esculentum</i>	127
Lhca1-matur.....	127
Lhca2-matur.....	128
Lhca3-matur.....	129
Lhca4-matur.....	130
Lhca5-precursor.....	131
<i>Arabidopsis thaliana</i>	132
Lhca5-precursor.....	132

Abkürzungen

Abb	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
Anthera	Antheraxanthin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
<i>A.th.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolylsulfat
β-Car	β-Carotin
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
°C	Grad Celcius
<i>cab</i>	„chlorophyll <i>a/b</i> binding“
Car	Carotinoid(e)
Chl <i>a</i>	Chlorophyll <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Chlorophyll <i>b</i>
ddH ₂ O	doppeldestilliertes H ₂ O
ddNTP	Dideoxynukleosidtriphosphat
dest.	destilliert
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat
DM	n-Dodecyl-β-D-Maltosid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiotreitol
<i>E.Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELIP	„early-light-inducible-protein“
HLIP	„high-light-inducible-protein“
HPLC	„High Pressure/Performance Liquid Chromatography“
IB	Inclusion Bodies
IEF	isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropyl-β-thiogalaktosid
K	Kelvin
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
KDS	Kaliumdodecylsulfat
LB	„Luria Bertani“
LDS	Lithiumdodecylsulfat
<i>L.esc.</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i> , Tomate
<i>lhca</i>	Gene für Lichtsammelkomplexe des PSI
Lhca	Apoproteine des Lichtsammelkomplexes des PSI
<i>lhcb</i>	Gene für Lichtsammelkomplexe des PSII
Lhcb	Apoproteine des Lichtsammelkomplexes des PSII
LHCI	„Light harvesting complex I“, Lichtsammelkomplex I
LHCII	„Light harvesting complex II“, Lichtsammelkomplex II
LHCIIb	majorer LHCII (aus Lhcb1-3)
Lut	Lutein
M	Molekularmassenstandard
M _r	Molekulargewicht

NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
Neo	Neoxanthin
NPQ	“non-photochemical quenching”
OD ₅₅₀	Optische Dichte bei 550 nm
OG	n-Octyl-β-D-Glucosid
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PG	Phosphatidylglycerin
pI	isoelektrischer Punkt
PS	Photosystem
r-LHC	rekonstituierter Lichtsammelkomplex
r-Lhc	rekonstituiertes Lhc-Protein
qE	pH-abhängige NPQ-Prozesse
RT	Raumtemperatur
RZ	Reaktionszentrum
SDG	Saccharosedichtegradient
SDS	Sodium(Natrium)dodecylsulfat
SEP	„Stress Enhanced Protein“
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
U	Unit
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
UZ	Ultrazentrifugation
V	Volt
Vio	Violaxanthin
WT	Wildtyp
Zea	Zeaxanthin
77 K	77 Kelvin, Tieftemperatur
(w/v)	“weight per volume”
(v/v)	“volume per volume”

A Einleitung

1. Der Photosyntheseapparat

Die Photosynthese der grünen Pflanzen und Cyanobakterien ist ein sehr effizientes System, die Energie des Sonnenlichtes zum Aufbau organischer Stoffe aus anorganischen Ausgangssubstanzen zu nutzen.

Der Ort der pflanzlichen Photosynthese sind die Chloroplasten, Zellorganellen, die durch zwei Hüllmembranen vom Cytosol der Zelle abgegrenzt werden und die vermutlich durch die Phagozytose eines Cyanobakterienvorläufers durch einen frühen einzelligen Eukaryoten entstanden (Endosymbiontentheorie). Das Innere der Chloroplasten enthält ein weiteres Membransystem, die Thylakoidmembran, die sich wiederum in stapelförmig angeordnete Grana- und diese verbindende Stromathylakoide unterteilen lässt. Man untergliedert den Photosynthesevorgang in zwei unterschiedliche Prozesse, die als Licht- und Dunkelreaktion bezeichnet werden. Die Komplexe der Lichtreaktion befinden sich in der Thylakoidmembran oder sind mit dieser assoziiert (Abb. 1), während die Enzyme der Dunkelreaktion im Chloroplastenstroma lokalisiert sind. Die Lichtreaktion dient der Umwandlung der „eingefangenen“ Sonnenenergie in Energie- und Reduktionsäquivalenten (ATP, NADPH). Dabei werden über eine Elektronentransportkette Elektronen aus der photolytischen Spaltung von Wasser auf NADP^+ übertragen und über der Thylakoidmembran wird ein Protonengradient aufgebaut, dessen Abbau von der ATP-Synthase (CF_0/CF_1 -Komplex) zur ATP-Synthese genutzt wird. In der Dunkelreaktion dienen die gebildeten Energie- und Reduktionsäquivalente der Fixierung von CO_2 in Form von Kohlenhydraten. Damit bildet die Photosynthese die Grundlage tierischen Lebens auf der Erde, da sie zum einen die organischen Stoffe liefert, aus deren Oxidation heterotrophe Organismen Energie gewinnen, und zum anderen den dafür notwendigen Sauerstoff produziert (Heldt, 2003).

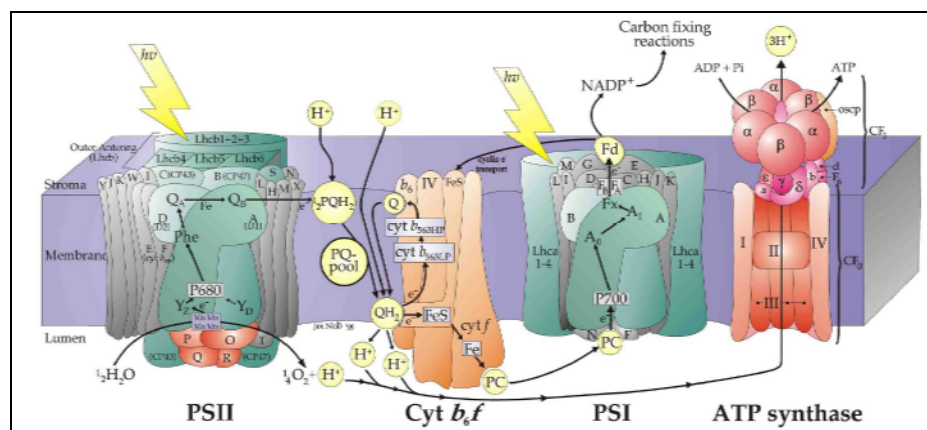


Abb. 1: Die Komponenten des Photosyntheseapparates (Modell nach Jon Nield, 2003). Dargestellt sind die beiden Photosysteme, der Cytochrom b_6f -Komplex und die ATP-Synthase eingebettet in die Thylakoidmembran.

Die lichtgetriebene Elektronentransportkette des pflanzlichen Photosyntheseapparates befindet sich wie in Abb. 1 dargestellt in der Thylakoidmembran und besteht aus zwei Photosystemen (PSII und PSI), dem Cytochrom b_6f -Komplex (Cyt b_6f -Komplex) und der ATP-Synthase. Beide Photosysteme bestehen jeweils aus einem Kernkomplex, der das Reaktionszentrum (RZ) mit einem speziellen Chlorophyll a (Chl a)-Dimer trägt, an dem die Ladungstrennung stattfindet, und einer Lichtsammelantenne (LHC = light-harvesting complex), die dazu dient den Absorptionsquerschnitt der PS zu vergrößern. Durch Einwirkung eines Photons werden die an die LHC gebundenen Chromophore angeregt und die Energie über excitonische Kopplung innerhalb der Antennen bis zum RZ des PSII weitergeleitet. Dort kommt es am P680 (Chl a -Dimer) zur Ladungstrennung und ein Elektron wird emittiert. Dieses wird über Moleküle mit abnehmendem Redoxpotential auf den Zweielektronenüberträger Plastochinon übertragen. Die am PSII entstandene Elektronenlücke wird durch die photolytische Wasserspaltung am wasserspaltenden Komplex (OEC, „oxygen evolving complex“), der auf der luminalen Seite der Membran mit dem PSII assoziiert ist, wieder aufgefüllt. Der Cyt b_6f -Komplex übernimmt Elektronen vom Plastochinon und reduziert seinerseits Plastocyanin (PC), einen Einelektronenüberträger auf der luminalen Seite der Thylakoidmembran. Von diesem werden Elektronen zum PSI transportiert, wo sie dazu dienen, die durch die Ladungstrennung am P700 entstandene Elektronenlücke zu schließen. Das vom P700 abgegebene Elektron wird wiederum über verschiedene Redoxkomponenten auf Ferredoxin (Fed) übertragen und letztendlich zur Reduktion von NADP^+ genutzt. Die Kopplung zweier Photosysteme, und damit die zweimalige Anregung eines Elektrons, ist nötig, um die Potentialdifferenz zwischen der Oxidation des Wassers und der Reduktion des NADP^+ zu überbrücken (Heldt, 2003).

Die beiden Photosysteme liegen in der Thylakoidmembran asymmetrisch verteilt vor. Das PSII inklusive seiner minoren LHC (CP29, CP26 und CP24) und dem majoren LHCIIB befindet sich überwiegend in den Granabereichen der Thylakoide während das PSI mitsamt seines Lichtsammelkomplexes im stromalen Bereich gehäuft vorkommt (Andersson und Anderson, 1988). Die ATP-Synthase befindet sich ebenfalls in den Stromathylakoiden (Cramer et al., 1985; Murphy, 1986). Lediglich der Cyt b_6f -Komplex ist relativ gleichmäßig über beide Bereiche verteilt (Olive et al., 1986).

2. Aufbau des PSI-LHCI-Holokomplexes

Über den Multiproteinkomplex des PSI werden Elektronen von PC auf der luminalen Seite der Thylakoidmembran auf Fed auf der stromalen Seite übertragen. Das PSI höherer Pflanzen besteht aus mindestens 18 Untereinheiten, von denen fünf chloroplastencodiert sind (Jensen et al., 2003). Vier der Kern-Untereinheiten (PSI-G, -H, -N und -O) und die vier Lichtsammelproteine (Lhca1-4) sind für das PSI höherer Pflanzen spezifisch und kommen im PSI von Cyanobakterien nicht vor (Jordan et al., 2001; Jensen et al., 2003). Insgesamt bindet der PSI-LHCI-Holokomplex etwa 200 Pigmentmoleküle (Scheller et al., 2001). In dem Strukturmodell des PSI von *Pisum sativum* (Erbse) mit einer Auflösung von 4.4 Å (Abb. 2), das kürzlich von Ben-Shem et al. (2003) veröffentlicht wurde, konnten 16 Untereinheiten und insgesamt 167 Chl-Moleküle zugeordnet werden. In Abb. 2 ist gut zu erkennen, dass der PSI-Holokomplex in zwei Unterbereiche eingeteilt werden kann. In einen Kernkomplex (Kap. A2.1), der zusätzlich zu den Komponenten der Elektronentransportkette auch Pigmente bindet, und eine äußere

Lichtsammelantenne (Kap A2.2), den sogenannten LHCI, der Lichtenergie absorbiert und an das RZ weiterleitet. Im Gegensatz zum PSI von Cyanobakterien, das *in vivo* Trimere bildet (Jordan et al., 2001), kommt das PSI höherer Pflanzen in monomerer Form vor.

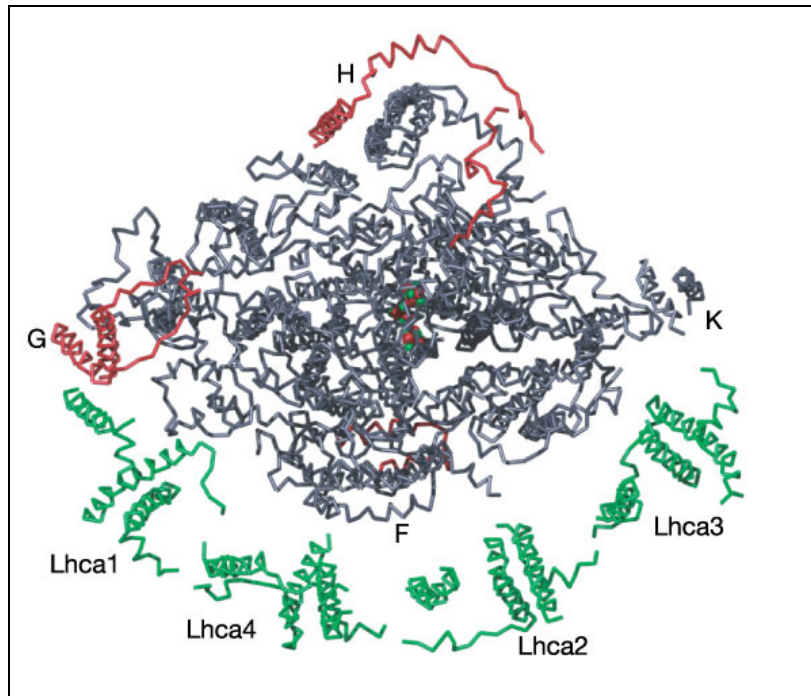


Abb. 2: Strukturmodell des PSI höherer Pflanzen (Ben-Shem et al., 2003). Abgebildet ist eine Aufsicht auf das Proteingerüst von der stromalen Seite aus. Die Auflösung beträgt 4.4 Å. Die im PSI von Cyanobakterien nicht vorkommenden Untereinheiten (PSI-H und PSI-G) sind rot und die Lichtsammelproteine (Lhca1 bis Lhca4) sind grün hervorgehoben. Im PSI von Cyanobakterien und höheren Pflanzen vorhandene Untereinheiten sind grau gehalten und die drei Eisen-Schwefel-Cluster sind als rote (Fe) und grüne (S) Kugeln dargestellt.

2.1 PSI-Kern-Komplex

Der Kernkomplex des PSI besteht aus mindestens 14 Untereinheiten (Tab. 1), deren Zentrum ein Heterodimer aus den Untereinheiten PSI-A und PSI-B bildet. Diese jeweils ca. 83 kDa großen Pigment-Proteinkomplexe binden zusammen mit PSI-C die an der Ladungstrennung beteiligten Cofaktoren. Der primäre Elektronendonator P700, ein Chl *a*-Dimer, und die Elektronenakzeptoren A₀ (ein Chl *a*), A₁ (ein Plastochinon) und F_x (ein 4Fe-4S-Cluster) werden von PSI-A und PSI-B ligiert, während PSI-C F_A und F_B, (zwei weitere 4Fe-4S-Cluster) koordiniert (Scheller et al., 2001; Ben-Shem et al., 2003). Außerdem binden PSI-A und PSI-B zusammen 93 Chl *a* (Ben-Shem et al. 2003) und 22 Carotinoide (Car) (Scheller et al., 2001) und sind somit zusätzlich an der Lichtsammelung beteiligt. Damit unterscheidet sich der Aufbau des PSI von dem des PSII (Rhee et al., 1998). Bei letzterem binden die RZ-Proteine (D1/D2) keine Pigmente, diese Aufgabe übernehmen die ebenfalls dem PSII-Kern zugerechneten inneren Antennen, bestehend aus PSII-B (CP47) und PSII-C (CP43). Die kleineren Untereinheiten des PSI gruppieren sich pseudosymmetrisch um PsaA und PsaB. Sie lassen sich in verschiedenen Gruppen einteilen. PSI-F, PSI-J und PSI-N liegen auf einer Seite des Kernkomplexes und sind direkt oder indirekt an der Bindung des PC auf der luminalen Seite des

Komplexes beteiligt (Haldrup et al., 1999, 2000). Ihnen gegenüber liegen PSI-H, PSI-I, PSI-L und PSI-O, die an der Assoziation des LHCI an das PSI unter state 2-Bedingungen beteiligt sind (Lunde et al., 2000; Jensen et al., 2004). Auf der stromalen Seite befinden sich neben PSI-C auch PSI-D und PSI-E, über die Fed an das PSI andockt (Fromme et al., 2003). Die letzten beiden Untereinheiten, PSI-G und PSI-K liegen einander gegenüber an der Peripherie des Kernkomplexes und sind an der LHCI-Bindung beteiligt (Jensen et al., 2000, siehe auch Kap. A2.2.3). Für PSI-G wird außerdem eine Funktion bei der Regulation des Elektronentransfers durch das PSI postuliert (Jensen et al., 2003). Ein aktueller Überblick über die Funktion der einzelnen Untereinheiten wird in Jensen et al. (2003) gegeben (Tab. 1).

Tab. 1: Untereinheiten des PSI-Kern höherer Pflanzen und ihre Funktion nach Jensen et al., 2003. Die angegebenen Molekularmassen wurden aus der Nukleotidsequenz berechnet.

Protein	Mr [kDa]	Funktion	Referenz
PSI-A	83.2	Lichtsammmlung	Rhee et al., 1998
PSI-B	82.4	Ladungstrennung Elektronentransport	Brettel et al., 1997; Brettel und Leibl, 2001
PSI-C	8.8	Elektronentransport	
PSI-D	17.6	Bindung von Fed Stabilisierung von PSI-C	Andersen et al., 1992a; Pandini et al., 1999 Naver et al., 1995
PSI-E	10.8	Bindung von Fed und FNR Zyklischer Elektronentransport	Andersen et al., 1992b van Thor et al., 1999
PSI-F	17.5	Bindung von PC Interaktion mit LHCI-730	Fischer et al., 1999 Haldrup et al., 2000
PSI-G	10.8	Interaktion mit LHCI-680 Regulation des Energietransfers vom LHCI zu PSI-Core	Jansson et al., 1996 Jensen et al., 2002
PSI-H	10.2	Bindung von LHCI Stabilisierung von PSI-D	Naver et al., 1999; Lunde et al., 2000 Andersen et al., 1992a; Jansson et al., 1996
PSI-I	4.0	Stabilisierung von PSI-L	Andersen et al., 1992a; Jansson et al., 1996
PSI-J	5.0	Stabilisierung von PSI-F	Jansson et al., 1996; Fischer et al., 1999
PSI-K	9.0	Interaktion mit LHCI-680 → speziell mit Lhca3	Kjaerulff et al., 1993; Jansson et al., 1996 Jensen et al., 2000; Moseley et al., 2002
PSI-L	18.0	Stabilisierung von PSI-H	Andersen et al., 1992a; Jansson et al., 1996
PSI-N	9.8	Bindung von PC	Haldrup et al., 1999, 2000
PSI-O	10.1	Bindung von LHCI	Jensen et al., 2004

2.2 Die Lichtsammelantenne des PSI

Die „äußere“ Antenne des PSI höherer Pflanzen wird von den sogenannten LHCI-Pigment-Proteinkomplexen gebildet. Dies sind Komplexe aus Proteinen und photosynthetisch wirksamen Pigmenten (Chl *a*, Chl *b*, Car), die dazu dienen, die Quantenausbeute der Photosynthese zu erhöhen. Die in ihnen organisierten Pigmente haben aufgrund unterschiedlicher Pigment-Protein-Wechselwirkungen unterschiedliche Absorptionsmaxima und sind so organisiert, dass zwischen ihnen ein schneller Energietransfer (Excitonentransfer) stattfinden kann. Zudem sind

sie so angeordnet, dass die eingefangene Energie nach dem Prinzip einer Sammelfalle an das RZ weitergeleitet wird. Dadurch steigt die Anregungswahrscheinlichkeit des RZ, und damit einhergehend die Effizienz der Photosynthese (Heldt, 2003).

2.2.1 Proteinzusammensetzung des LHCI

Biochemische Untersuchungen zeigten, dass sich der LHCI höherer Pflanzen aus vier Apoproteinen mit Molekularmassen zwischen 21 und 25 kDa zusammensetzt, die in einer 1:1:1:1 Stöchiometrie vorkommen (Haworth et al., 1983). Nach den für sie codierenden Genen werden sie mittlerweile als Lhca1 bis Lhca4 bezeichnet (Jansson et al., 1994). Die Isolation des LHCI per Saccharosedichtegradienten-Ultrazentrifugation (SDG-UZ) führte zur Auftrennung von zwei LHCI-Subfraktionen (Lam et al., 1984), die sich in ihrer 77K-Fluoreszenzemission unterscheiden und entsprechend ihres Fluoreszenzmaximums als LHCI-730 und LHCI-680 bezeichnet werden (Bassi et al., 1985). Die Subfraktion LHCI-730 enthält die beiden Apoproteine Lhca1 und Lhca4 (Ikeuchi et al., 1991), die ein Heterodimer bilden (Tjus et al., 1995, Schmid et al., 1997). Dieser dimere Komplex kann auch *in vitro* aus rekombinanten Lhca1- und Lhca4-Apoproteinen rekonstituiert werden (Schmid et al., 1997; Croce et al., 2002a). Der per SDG-UZ isolierte LHCI-680 stellt eine Mischung aus monomerem Lhca2 und Lhca3 dar (Ikeuchi et al., 1991). Mittels nativer Gelelektrophorese konnten Knoetzel et al. (1992) den LHCI-680 von *Hordeum vulgare* (Gerste) nochmals in zwei Fraktionen auftrennen, in denen jeweils eines der Apoproteine Lhca2 (LHCI-680A) oder Lhca3 (LHCI-680B) angereichert ist.

Aufgrund spektroskopischer Untersuchungen wird allerdings angenommen, dass *in vivo* alle Lhca-Proteine als Dimere vorkommen (Ihalainen et al., 2000; Croce et al., 2002a). Ob Lhca2 und Lhca3 dabei als Homo- oder als Heterodimere vorliegen ist noch Gegenstand von Diskussionen. Untersuchungen an Lhca2- und Lhca3-antisense-Pflanzen (Ganeteg et al., 2001) und Δ PsaK A. *thaliana*-Mutanten (Jensen et al., 2000) deuten auf eine Interaktion von Lhca2 und Lhca3 hin. Da in „crosslinking“-Experimenten jedoch nur Lhca2/Lhca2- und Lhca3/Lhca3-Produkte und keine Lhca2/Lhca3-Komplexe entstanden (Jansson et al., 1996), ging man bisher eher von der Existenz von Lhca2 und Lhca3-Homodimeren aus, die allerdings miteinander in Kontakt stehen (Scheller et al., 2001).

Betrachtet man jedoch die kürzlich erschienene Kristallstruktur des PSI von Erbse (Ben-Shem et al., 2003, Abb. 2), die insgesamt nur vier LHC-Monomere enthält, und zieht in Betracht, dass in biochemischen Analysen die vier Lhca-Apoproteine in nahezu gleicher Anzahl gefunden werden (Ballottari et al., 2004), so erscheint ein Lhca2/Lhca3-Heterodimer als wahrscheinlichste Variante. Die Tatsache, dass bisher noch keine wie auch immer gearteten Lhca2- und/oder Lhca3-Dimere isoliert werden konnten, deutet daraufhin, dass die Interaktion zwischen Lhca2 und/oder Lhca3 wesentlich schwächer sein muss, als die zwischen Lhca1 und Lhca4.

Überhaupt ist die Fähigkeit zur Bildung von Oligomeren, ein Merkmal, in dem sich die verschiedenen Lhc-Proteine unterscheiden. Während der Hauptlichtsammeler des PSII, LHCIIb, als Heterotrimer aus Lhcb1, Lhcb2 und Lhcb3 vorkommt (Jackowski et al., 2001; Caffarri et al., 2004, Standfuss et al., 2004), liegen die minoren LHC des PSII (CP24, CP26, CP29) als Monomere vor (Dunahay et al., 1987; Dainese und Bassi, 1991; Peter und Thornber, 1991).

2.2.2 Gene der LHCI-Proteine in *Arabidopsis* und Tomate

Die ersten für ein LHCI-Protein codierenden DNA-Sequenzen wurden in Tomate entdeckt. Beide Gene codierten für den Lhca1 und wurden als *cab6a* und *cab6b* bezeichnet (Hoffmann et al., 1987; Pichersky et al., 1987a), wobei „cab“ für Chl *a/b*-bindend steht. In den folgenden Jahren wurden für Tomate auch Gene für Lhca2 (*cab7*, Pichersky et al., 1988), Lhca3 (*cab8*, Pichersky et al., 1989) und zwei Isoformen des Lhca4 (*cab11* und *cab12*, Schwartz et al., 1991) beschrieben. Damit enthält das Genom von Tomate Sequenzen für sechs potentielle Lhca-Proteine. Für *A. thaliana* wurde für jedes der vier Haupt-Lhca-Proteine (Lhca1-4) nur ein Gen gefunden (Jansson, 1999). Jedoch wurden durch EST-Datenbanksuche in *A. thaliana* zwei weitere Gene identifiziert, die für zusätzliche potentielle Lhca-Proteine codieren (*lhca5* und *lhca6*; Jansson 1999). Bisher konnten allerdings weder in Tomate noch in *A. thaliana* auf Proteinebene Lhca-Isoformen detektiert werden. Dieser fehlende Nachweis lässt sich zumindest für *lhca5* und *cab12* auf einen im Vergleich zu den anderen *lhca*-Genen niedrigen Expressionslevel und daraus bedingten niedrigen Proteinlevel zurückführen (Jansson, 1999 bzw. Schwartz et al., 1991). Für *lhca6*, das große Ähnlichkeit mit *lhca2* hat, und deshalb teilweise als *lhca2*-Isoform bezeichnet wird, steht noch nicht fest, ob es überhaupt exprimiert wird, oder ob es sich dabei um ein Pseudogen handelt (Jansson, 1999).

In Tab. 2 sind die für diese Arbeit relevanten Bezeichnungen der *lhca*-Gene und die daraus resultierenden Proteine mitsamt ihren aus der Nukleotidsequenz berechneten (theoretischen) Molekulargewichten und isoelektrischen Punkten zusammengestellt.

Tab. 2: Protein- und Genzusammensetzung des LHCI von *A. thaliana* und Tomate. Zusätzlich sind für jedes Protein das aus der cDNA-Sequenz abgeleitete theoretische Molekulargewicht (M_r) und der daraus berechnete isoelektrische Punkt (pI) angegeben. Die angegebene Referenz bezieht sich auf die Acc. Nr. der NCBI-Datenbank.

Protein	Gen		M_r	pI	Referenz
Lhca1	<i>cab6a</i>	Tomate	21879,07	5.22	S00443
	<i>cab6b</i>	Tomate	21851,06	5.22	P12360
	<i>lhca1</i>	<i>A. thaliana</i>	21543,71	5.37	M85150
Lhca2	<i>cab7</i>	Tomate	23178,48	4.99	P10708
	<i>lhca2</i>	<i>A. thaliana</i>	23200,47	5.01	AF134120
Lhca3	<i>cab8</i>	Tomate	25043,74	5.95	P27522
	<i>lhca3</i>	<i>A. thaliana</i>	24936,57	5.63	U01103
Lhca4	<i>cab11</i>	Tomate	22308,44	5.34	S14305
	<i>cab12</i>	Tomate	22286,38	5.15	S14306
	<i>lhca4</i>	<i>A. thaliana</i>	22255	5.07	M63931
???	<i>lhca5</i>	<i>A. thaliana</i>	24286,94	5.33	AF134121
???	<i>lhca6</i>	<i>A. thaliana</i>	24549,09	5.06	U03395

*Die Bezeichnungen „cab6a“ und „cab6b“ werden in der Literatur irreführend verwendet. Die von Pichersky et al. (1987a) beschriebenen Gene (*cab6a* und *cab6b*) codieren für das identische Protein (S00443). Allerdings gibt es in der NCBI-Datenbank eine weitere DNA-Sequenz (P12360), die für ein weiteres Lhca1-Protein codiert, das sich von dem *cab6a/b*-Genprodukt im Bereich des muren Proteins in 3 AS unterscheidet. Dieses Protein wurde bislang als *cab6b* bezeichnet. Dies wird in dieser Arbeit beibehalten, obwohl es besser wäre dieses Protein als *cab6c* zu bezeichnen.

2.2.3 Assoziation des LHCI mit dem PSI-Kern

Erste Hinweise auf die Zahl der in höheren Pflanzen an den PSI-Kern gebundenen LHC und ihre Orientierung am PSI-Kern stammen aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Boekema et al. (1990). Diese wurden dahingehend interpretiert, dass ein Ring bestehend aus acht LHCI-Monomeren den PSI-Kern umgibt. Weitere elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten jedoch, dass der LHCI nur auf einer Seite, und zwar der Seite der Untereinheiten PSI-F/J, mit dem PSI-Kern assoziiert ist, und möglicherweise aus nur sechs Untereinheiten besteht (Boekema et al., 2001). Dem widersprechen jedoch anscheinend biochemische Analysen der LHCI-Proteinzusammensetzung, die zeigen, dass die vier Apoproteine des LHCI immer in annähernd gleicher Anzahl vorliegen (Croce und Bassi, 1998; Schmid et al., 2002a; Ballottari et al., 2004). In der kürzlich veröffentlichten Kristallstruktur des PSI-LHCI-Komplexes von Erbse konnten passend dazu nur vier LHCI-Monomere aufgelöst werden, die auf der Seite der PSI-F/J-Untereinheiten dem Kernkomplex angelagert sind (Ben-Shem et al., 2003; Abb. 2).

Das PSI der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) bindet dagegen wesentlich mehr LHCI-Monomere pro PSI-Kern. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass der PSI-LHCI-Komplex größer ist als der höherer Pflanzen (Kargul et al., 2003). Der Vergleich dieser elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit der PSI-Struktur aus Erbse deutet daraufhin, dass 9 bis 10 LHCI-Monomere in zwei Reihen an den PSI-Kern gebunden werden (Dekker und Boekema, 2005). Dies stimmt mit der biochemisch (10 LHCI) und massenspektroskopisch (9 LHCI) ermittelten Anzahl an LHC-Monomeren pro PSI-Kern überein (Bassi et al., 1992, Takahashi et al., 2004) und korrespondiert ebenfalls mit der größeren Anzahl an in *C. reinhardtii* gefundenen *Lhca*-Genen (siehe Stauber et al., 2003).

Es wird angenommen, dass der LHCI über Interaktionen mit kleinen PSI-Untereinheiten an den PSI-Kern assoziiert ist. Entfernt man PSI-K aus dem PSI-LHCI-Komplex, so lösen sich auch die LHCI-Proteine vom PSI-Kern (Kjaerulff et al., 1993). Außerdem wurde in Studien an Δ PsaK-Mutanten von *A. thaliana* ein reduzierter Energietransfer zwischen LHCI und PSI-Kern beobachtet, der mit der Abnahme von Lhca2 (20%) und Lhca3 (30%) einherging (Jensen et al., 2000; Varotto et al., 2002). Insgesamt war die LHCI-Antenne in diesen PsaK-„antisense“-Mutanten um 10-15% reduziert (Jensen et al., 2002). Da in „crosslinking“-Studien ein Lhca3/PSI-K-Produkt beobachtet werden konnte (Jansson et al., 1996), und für *C. reinhardtii* eine Interaktion zwischen Lhca3 und PSI-K beschrieben ist (Moseley et al., 2002), deutet dies auf eine Interaktion der LHCI-680-Proteine bzw. speziell von Lhca3 mit PSI-K hin. Für Lhca2 wurde ein „crosslinking“-Produkt mit PSI-G beschrieben (Jansson et al., 1996). In Gerste-Mutanten, die außer PSI-G nur sehr geringe Mengen der übrigen PSI-Kernuntereinheiten besitzen (Nielsen et al., 1996) liegen dennoch alle LHCI-Proteine in normalen Mengen vor (Knoetzel et al., 1998), was auf die Beteiligung von PSI-G an der Assoziation der LHCI-Monomere hindeutet. Außerdem stabilisiert PSI-G die LHCI-Bindung an den PSI-Kern und ist an der Regulation des Elektronentransports durch das PSI beteiligt (Jensen et al., 2002). Für die Proteine des LHCI-730 wird eine Interaktion mit PSI-F angenommen, da in Δ PsaF-Mutanten von *A. thaliana* keine Energieübertragung zwischen LHCI-730 und dem PSI-Kern mehr nachgewiesen werden konnte (Haldrup et al., 2000).

Bezogen auf das PSI-Strukturmodell (Ben-Shem et al., 2003, Abb. 2) wurden die oben beschriebenen biochemischen Untersuchungen folgendermaßen interpretiert:

Lhca1 interagiert mit der Kernuntereinheit PsaG über eine relativ stabile Helix-Helix-Interaktion und mit Lhca4, mit dem es ein stabiles Heterodimer bildet (Schmid et al., 1997; Schmid et al., 2002b), und dient dadurch als „Anker“ für die anderen LHC-Monomere. Zwischen diesen und weiteren kleinen Kernuntereinheiten bestehen zwar auch Interaktionen, die allerdings alle relativ schwach sind. So interagiert Lhca4 mit Psa-F, für das eine Interaktion mit LHCI-730 bereits beschrieben wurde (Haldrup et al., 2000). Der PSI-K am nächsten liegende LHC wurde aufgrund der oben beschriebenen Beobachtungen als Lhca3 bezeichnet. Eine Lhca-Stöchiometrie von 1:1:1:1 vorausgesetzt, muß es sich folglich bei dem zwischen Lhca3 und Lhca4 liegenden LHC, der mit PsaJ interagiert, um Lhca2 handeln. Demnach wäre die Abnahme von Lhca2 in den Δ PsaK-Mutanten von *A. thaliana* (Jensen et al., 2000) nicht auf eine direkte Interaktion, sondern auf die stabilisierende Wirkung von Lhca3 auf die Bindung von Lhca2 an den PSI-Kern zurückzuführen.

2.3 Variation der Größe und Proteinzusammensetzung der PSI-Antenne

Obwohl in der Regel in LHCI-Präparationen die „Standard“-Lhca-Proteine in einer 1:1:1:1-Stöchiometrie vorkommen (Ballottari et al., 2004), gibt es auch Hinweise darauf, dass die Größe und Zusammensetzung der PSI-Antenne variabel ist. So wurden für Grana- und Stromathylakoide zwei PSI-Populationen beschrieben (Svensson et al., 1991), die sich in ihrer Antennenzusammensetzung und -größe unterscheiden (Jansson et al., 1997). Zusätzlich zeigten Untersuchungen an Gerstemutanten mit gestörter Chl *b*-Synthese und verschiedene Lhca-„knockout“-Mutanten von *A. thaliana*, dass die Proteinzusammensetzung und Größe des LHCI variabel ist (Bossmann et al., 1997; Zhang et al., 1997; Ganeteg et al., 2001) und in Abhängigkeit von den Lichtbedingungen bei der Anzucht wurden in *A. thaliana* PSI mit unterschiedlichen Mengen an Lhca1 und Lhca4 beobachtet (Bailey et al., 2001). Für *C. reinhardtii* wurde eine Veränderung der PSI-Antenne als Folge von Eisenmangel beschrieben (Moseley et al., 2002). Nicht zuletzt kann auch der LHCI unter „state 2“-Bedingungen an das PSI andocken, und dadurch die PSI-Antenne vergrößern (Allen und Forsberg, 2001, Haldrup et al., 2001). Auch Proteinanalysen von PSI-Präparationen von Gerste und Tomate deuten auf eine größere Proteinvialt des LHCI hin, da hierbei in eindimensionalen Polyacrylamidgelen das Auftreten einer fünften Proteinbande im LHCI-Bereich beobachtet wurde (Knoetzel et al., 1992; Schmid und Schmidt, unveröffentlicht).

Verbesserungen bei der zweidimensionalen Gelaufftrennung und der massenspektrometrischen Analyse von Membranproteinen erlauben mittlerweile die detaillierte Untersuchung der LHCI-Proteinzusammensetzung. So führte die Kombination von zweidimensionaler Gelelektrophorese und Massenspektrometrie in *C. reinhardtii* zur Identifizierung von unterschiedlich prozessierten oder modifizierten Lhca-Isoformen (Hippler et al., 2001) und von zusätzlichen Lhca-Proteinen (Stauber et al., 2003). Außerdem wurden in rein massenspektrometrischen Untersuchungen des PSI höherer Pflanzen (*A. thaliana*, Tomate, Gerste) ebenfalls zusätzliche Lhca-Isoformen entdeckt (Zolla et al., 2002, Huber et al., 2004). Zusammengenommen deuten diese Befunde daraufhin, dass der LHCI komplexer zusammengesetzt sein könnte als bisher angenommen.

3. Lichtsammelproteine

Die Apoproteine der Lichtsammelkomplexe des PSI (Lhca1-4) und PSII (Lhcb1-6) gehören zur Multigenfamilie der Chl *a/b*-bindenden Proteine (*cab*-Proteine; Green et al., 1991). Zu dieser Familie gehört auch eine weitere Gruppe von stressinduzierten Membranproteinen, die in die „early light induced proteins“ (ELIPs), die unter Lichtstress exprimierten „high light induced proteins“ (HLIPs) und die „stress enhanced proteins“ (SEPs) unterteilt wird (Adamska, 2001). Außerdem wird das PsbS, ein mit dem PSII assoziiertes, 22 kDa großes, intrinsisches Membranprotein mit vier transmembranen Helices (Funk et al., 1995; Li et al., 2000) ebenfalls zu den *cab*-Proteinen gezählt. Alle Mitglieder dieser „Familie“ weisen relativ große Homologien in der Aminosäuresequenz (AS-Sequenz) auf (Pichersky und Jansson, 1996), weshalb man annimmt, dass sie von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen. Es wird vermutet, dass es sich dabei um ein zwei-Helix-Protein handelte, aus dem sich zunächst durch Genduplikation ein vier-Helix-Protein und daraus durch Deletion der drei-Helix-Typ der LHCII/I und „ELIPs“ entwickelt hat (Green und Pichersky, 1994). SEPs und HLIPs werden auf Grund von Sequenzanalogien ebenfalls zu der Großfamilie gezählt, obwohl sie nur zwei bzw. eine Helix besitzen. Es wird angenommen, dass alle *cab*-Proteine Pigmente (Chl, Car) binden, wenn auch in unterschiedlicher Stöchiometrie. Allerdings wurde dies z.B. für das PsbS noch nicht eindeutig nachgewiesen (Funk et al., 1995; Dominici et al., 2002).

Die Lhc-Proteine des PSI (Lhca1-4) und der majoren (Lhcb1-3) und minoren (Lhcb4-6) LHC des PSII von *A. thaliana* sind zwischen 21 und 29 kDa groß, und weisen AS-Sequenzidentitäten von mehr als 35% auf (Jansson, 1999). Die AS-Sequenzidentität der unterschiedlichen Lhca-Proteine von Tomate beträgt zwischen 35,6% und 52,8%, die der beiden Lhca4-Isoformen *cab11* und *cab12* liegt bei 91% (Tab. 3, siehe auch Kap. A2.2.2). Alle Lhc-Proteine sind kerncodiert, werden im Stroma synthetisiert und posttranslational in die Thylakoidmembran inseriert, wobei ein N-terminales Signalpeptid abgespalten wird und das mature Lhc-Protein entsteht (Lubben et al., 1988).

Tab. 3: Sequenzidentität der Lhca-Proteine von Tomate. Die Werte wurden mit Hilfe des Align-Programmes des GENESTREAM network servers (<http://www2.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>) ermittelt.

	Lhca1	Lhca2	Lhca3	Lhca4 (<i>cab11</i>)
Lhca2	39,8%			
Lhca3	35,6%	42,7%		
Lhca4 (<i>cab11</i>)	38,4%	52,4%	41,5%	
Lhca4 (<i>cab12</i>)	37,9%	52,8%	39,8%	91,0%

Die Untersuchung der Eigenschaften von *cab*-Proteinen wird dadurch erleichtert, dass es möglich ist, *in vitro* aus nativen oder rekombinanten Apoproteinen und isolierten Pigmenten einen dem nativen LHC vergleichbaren Pigment-Protein-Komplex nachzubauen (Plumley und Schmidt, 1987; Paulsen et al., 1990). In dieser Arbeit wurde zur Rekonstitution eine für Lhca-Proteine adaptierte Variante der von Paulsen et al. (1993) entwickelten Detergenswechsel-Rekonstitution verwendet (Schmid et al., 1997, siehe auch Kap. C2.4). Untersuchungen an verschiedenen Lhc-Proteinen zeigten, dass die rückgefalteten LHC sich in ihren spektroskopischen und biochemischen Eigenschaften kaum von den entsprechenden nativen LHC

unterscheiden (z.B. Paulsen et al., 1993; Giuffra et al., 1996; Melkozernov et al., 1998). Im folgenden Text werden rekonstituierte LHC, wenn es um die Unterscheidung zwischen LHC mit unterschiedlichen Lhc-Apoproteine geht als r-Lhca und r-Lhcb, oder allgemein als r-LHC bezeichnet.

3.1 Struktur von Lichtsammelkomplexen

Erste Hinweise auf die Struktur der cab-Proteine stammen von Hydropathie-Plots (Green et al., 1991). Diese deuteten darauf hin, dass es sich bei den drei in allen cab-Proteinen vorkommenden hydrophoben Regionen, von denen die erste und dritte innerhalb der cab-Proteine hohe Homologien aufweisen, um helicale Transmembranbereiche handelt. Die von Kühlbrandt et al. (1994) elektronenmikroskopisch ermittelte Struktur des majoren LHCIIb mit einer Auflösung von 3.4 Å bestätigte diese Annahme. Der LHCII, der als gemischte Trimere aus Lhcb1 bis Lhcb3 in der Thylakoidmembran vorliegt (Jackowski et al., 2001), ist das häufigste Protein der Thylakoidmembran, wenn nicht das häufigste Membranprotein überhaupt, und bindet etwa 50% der an der Photosynthese beteiligten Chl (Peter und Thornber, 1991). Außerdem ist er was Struktur und Pigmentbindung angeht das am besten untersuchte Protein der Lhc-Familie. Die Struktur des LHCII aus *Spinacia oleracea* (Spinat) konnte kürzlich von Liu et al. (2004) mit einer Auflösung von 2.72 Å röntgenkristallographisch bestimmt werden (Abb. 3) und wird hier als Beispiel für die LHC-Struktur vorgestellt.

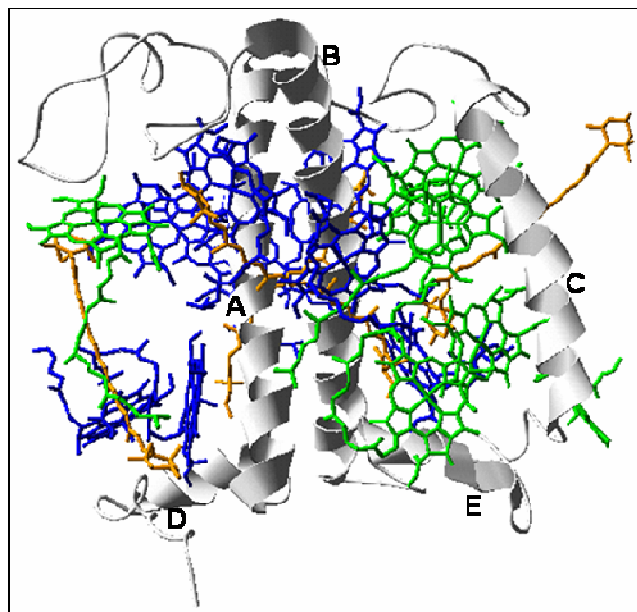


Abb. 3: Seitenansicht eines LHCIIb-Monomers (Modell nach Liu et al., 2004). Dargestellt sind die fünf α -helicalen Bereiche (A-E, grau), die Xantophyllmoleküle (orange) und die durch das Proteinrückgrat koordinierten Chlorophylle (Chl a blau, Chl b grün).

Das Apoprotein eines nativen LHCII-Monomers organisiert 14 Chl, davon 8 Chl *a* und 6 Chl *b*, und vier Carotinoide. Die Pigmente sind nicht kovalent an das Apoprotein gebunden, sondern werden über Interaktionen mit den Aminosäureseitenketten und den Carbonylgruppen des Peptidrückgrats in Position gehalten (Kühlbrandt et al., 1994; Liu et al., 2004). Der LHCII besitzt

drei membrandurchspannende Helices, von denen zwei (A und B) in einem Winkel von 30° gegenüber der Membrannormalen in der Membran vorliegen, so dass sie in der Aufsicht ein Kreuz bilden. Im Kreuzungsbereich, nahe dem Membranzentrum, bilden diese Helices eine „supercoiled“ Struktur und werden durch Ionenbindungen zwischen Arginin- und Glutaminresten zusammengehalten. In die Furchen der sich kreuzenden Helices eingefügt liegen zwei Luteine (Lut) in einem Winkel von 50° zur Membrannormalen. Sie überkreuzen sich ebenfalls und wechselwirken sowohl miteinander als auch mit den Polypeptidketten. Helix B ist 51 \AA lang und besitzt 9,5 Windungen, Helix A hat eine Länge von 43 \AA und durchspannt die Membran in acht Windungen und Helix C steht senkrecht zur Membran mit 5,5 Windungen und einer Länge von 31 \AA . Der N-Terminus und die Verbindung zwischen Helix A und C befinden sich auf der stromalen Seite der Membran. Der C-Terminus mit der relativ kurzen Helix D mit nur etwa drei Windungen und amphipatischem Charakter befindet sich genauso auf der luminalen Seite der Membran wie die Verbindung zwischen Helix B und C, die ebenfalls einen helicalen Bereich (Helix E) enthält. Am N-Terminus ließen sich die ersten 13 AS, in denen eine Phosphorylierungsstelle vermutet wird (Allen, 1995), nicht zuordnen. Neben den beiden Lut (s.o) enthält der LHCIIb pro Monomer zwei weitere Xanthophylle, ein Neoxanthin (Neo), das beinahe waagrecht zur Membrannormalen liegt und weit aus dem Proteingerüst herausragt, und ein Violaxanthin (Vio), das sich senkrecht zur Membran an der Seite eines LHCII-Monomers, und somit im Trimer an der Kontaktstelle zweier Monomere, befindet.

In biochemischen Untersuchungen von r-Lhcb1 weisen dessen Carotinoidbindungsstellen für die verschiedenen Xanthophylle unterschiedliche Affinitäten auf (Croce et al., 1999a+b; Hobe et al., 2000; Jahns et al., 2001) und werden deshalb als V1 (bevorzugt Vio), N1 (bevorzugt Neo), L1 (exklusiv Lut) und L2 (bevorzugt Lut) bezeichnet.

Aufgrund der hohen AS-Sequenzhomologie zwischen den Lhca-Proteinen und den Apoproteinen des LHCIIb wurde angenommen, dass die Tertiärstruktur der LHCI-Monomere der des LHCIIb ähnelt (Green et al., 1991; Jansson, 1994; Pichersky und Jansson, 1996). Dies wurde durch die Röntgenstruktur des PSI-LHCI-Komplexes aus Erbse bestätigt, die allerdings zu Beginn dieser Arbeit noch nicht vorlag (Ben-Shem et al., 2003). Die Auflösung ist hierbei mit 4.4 \AA zu gering, um einzelne Aminosäuren zuordnen zu können, aber die Ähnlichkeit der Struktur der LHCI-Monomere mit der des LHCIIb ist offensichtlich, wie in der Darstellung eines Lhca1-Lhca4-Dimers in Abb. 4 zu sehen ist.

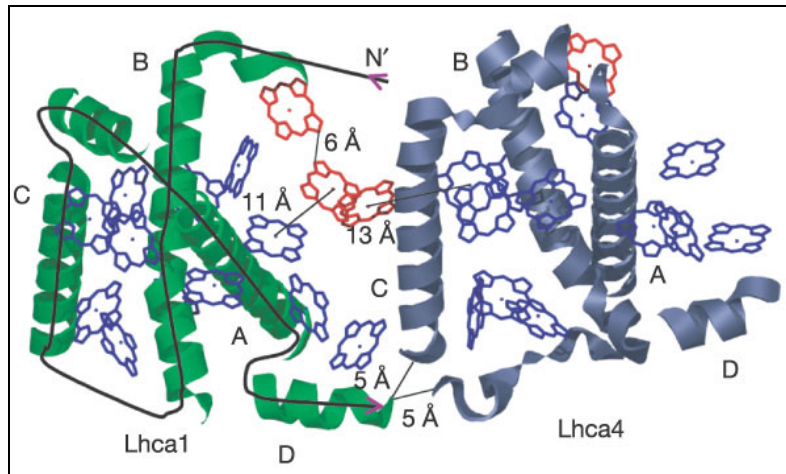


Abb. 4: Seitenansicht eines Lhca1/Lhca4 Dimers (Modell nach Ben-Shem et al., 2003); Dargestellt sind die α -helicalen Bereiche (grün, hellblau), und die durch das Proteinrückgrat koordinierten Chlorophylle (blau). Rot eingezeichnete Chlorophylle sind nur im Dimer vorhanden („linker“-Chlorophylle).

Die vier LHC-Monomere besitzen ebenfalls drei transmembrane Helices (A-C), von denen zwei sich überkreuzen. Zusätzlich konnten bei allen LHCI-Monomeren eine amphipatische Helix (D) am C-Terminus und bei Lhca4 ein helicaler Bereich im luminalen Loop zwischen Helix B und C aufgelöst werden. In Abb. 4 erkennt man, dass im Dimer der N- und C-Terminus des einen Proteins mit der zweiten Helix bzw. der luminalen Schleife des anderen Proteins interagiert. Dies entspricht dem Interaktionsmodus, der für Lhca1 und Lhca4 beschrieben wird (Schmid et al., 2002b). Außerdem ist zu sehen, dass jedes Monomer 12 Chl bindet, deren Lage und Orientierung im Wesentlichen mit der im LHCII-Monomer übereinstimmt. Allerdings konnte nicht zwischen Chl a und Chl b unterschieden werden. Zusätzlich zu diesen Chl befinden sich an den Interaktionsflächen der Monomere bzw. zwischen den beiden Dimeren noch zusätzliche Chl, die als „linker-Chl“ bezeichnet werden. Insgesamt koordiniert der LHCI somit 56 Chl. Außerdem konnten zwischen dem LHCI und dem PSI-Kern zehn weitere Chlorophylle aufgelöst werden („gap“-Chlorophylle), die den Kernuntereinheiten zugerechnet werden, im PSI von Cyanobakterien jedoch nicht vorkommen (Jordan et al., 2001). Im Unterschied zum Modell des LHCIIb (Liu et al., 2004) konnten in der PSI-LHCI-Struktur auf Grund der geringen Auflösung keine Xanthophylle aufgelöst werden.

3.2 Pigmentbindung der Lhc-Proteine

Sequenzvergleiche und Mutationsanalysen der Lhc-Proteine zeigten, dass fast alle Aminosäuren, die im LHCIIb als Chl-bindend identifiziert wurden (Remelli et al., 1999; Rogl et al., 1999, Yang et al., 1999), auch in den anderen Lhcs konserviert sind (Pichersky und Jansson, 1996; Bassi et al., 1999; Jansson, 1999; Morosinotto et al., 2002a), so dass zu vermuten ist, dass alle Lhc-Proteine eine ähnliche Anzahl von Pigmenten binden können.

In Tab. 4 sind die bis zu Beginn dieser Arbeit für verschiedene Lhc-Proteine ermittelten Pigmentdaten zusammengestellt. Da die Isolierung des LHCI wesentlich schwieriger ist als die der LHCII-Komponenten, lagen zu Beginn dieser Arbeit für die LHCI-Proteine nur relativ ungenaue Pigmentbindungsdaten vor (Damm et al.; 1990, Schmid et al., 1997; Croce und Bassi, 1998). Diese wiesen darauf hin, dass von den Lhca-Proteinen im Schnitt sieben bis zehn

Chl, etwa ein Lut und substöchiometrische Mengen an Vio und β -Carotin (β -Car) gebunden werden. Mittlerweile wurden in der Struktur des PSI von Erbse wie oben beschrieben 12 Chl pro Monomer gefunden (Ben-Shem et al., 2003), im Gegensatz zu 14 Chl im LHCIIb (Liu et al., 2004). Darüber welche Chl-Art gebunden wird und wieviele Carotinoide die Proteine des LHCI koordinieren gibt die Struktur allerdings keinen Aufschluß.

Betrachtet man die biochemischen ermittelten Pigmentdaten (Tab. 4), so fällt auf, dass sich Menge, Art und Stöchiometrie der von den verschiedenen Mitgliedern der Lhc-Familie koordinierten Pigmente unterscheiden, obwohl alle Lhc eine hohe Sequenzhomologie aufweisen. So schwankt das Chl *a/b*-Verhältnis zwischen 1,2 für natives CP24 (Pagano et al., 1998) und 4,0 für nativen LHCI aus Mais (Croce und Bassi, 1998), und die Angaben zu der pro Apoprotein gebundenen Chl-Menge liegen zwischen fünf Chl für r-Lhca1 und r-Lhca4 (Schmid et al., 1997) und 13 Chl im LHCII-Trimer (Caffarri et al., 2001). Auch bei der Carotinoidbindung gibt es Unterschiede. Majorer LHCIIb bindet 3-4 Carotinoide, davon 2 Lut, 1 Neo und 0,5-1 Vio (Caffarri et al., 2001). Die minore LHCII und der LHCI enthalten mit 2 bzw. 1,5 Carotinoiden deutlich weniger Carotinoide und auch die Carotinoidzusammensetzung ist anders. CP29 und CP26 binden ein Lut und substöchiometrische Mengen an Vio und Neo (Giuffra et al., 1996; Croce et al., 2002b), CP24 bindet sogar nur zwei Carotinoidspezies (Lut, Vio; Pagano et al., 1998). Außerdem wurde in nativem LHCI β -Car an Stelle von Neo gefunden (z.B. Schmid et al., 1997; Croce und Bassi, 1998).

Tab. 4: Pigmentbindung von nativen und rekonstituierten Lhc-Proteinen des PSI und PSII. Die hier zusammengestellten Daten entsprachen dem Wissensstand zu Beginn dieser Arbeit. Die mit * gekennzeichneten r-LHC wurden mit Gesamtpigmentextrakt rekonstituiert, das Neoxanthin enthielt.

LHC	Neo	Vio	Lut	Chl b	Chl a	β -Car	Quelle
r-LHCII-Trimer	1.0	0.2	1.8	5	7	-	Caffarri et al., 2001
n-LHCII-Trimer	1.0	0.7	2.1	5.15	7.85	-	Caffarri et al., 2001
r-Lhcb1	1.1	0.3	1.7	5	7	-	Remelli et al., 1999
n-CP29	0.6	0.7	0.6	2.1	5.9	-	Giuffra et al., 1996 Pascal et al., 1999
r-CP29	0.5	0.6	0.9	2	6	-	Bassi et al., 1999
n-CP26	0.6	0.4	1.0	2.8	6.2	-	Croce et al., 2002b
r-CP26	0.8	0.3	1.0	2.8	6.2	-	Croce et al., 2002b
n-CP24	-	0.5	1.5	2.3	2.7	-	Pagano et al., 1998
r-CP24	0.01*	0.7	1.3	4.2	5.8	-	Pagano et al., 1998
n-LHCI	-	0.4	0.9	2	8	0.3	Croce und Bassi, 1998
n-LHCI-730	-	0.4	0.8	2	5.2	0.2	Schmid et al., 1997
r-LHCI-730	0.1*	0.3	1.1	2	4.9	0.2	Schmid et al., 1997
r-Lhca1	0.15*	0.2	0.9	1.25	4.0	0.1	Schmid et al., 1997
r-Lhca4	0.1*	0.2	1.0	1.5	3.8	0.1	Schmid et al., 1997

Ein interessantes in LHC-Pigmentstudien beobachtetes Phänomen ist die Korrelation zwischen dem Chl *a/b*-Verhältnis eines LHC und der für seine Rekonstitution benötigten Chl-Spezies (Paulsen et al., 1990, Schmid et al., 1998; Croce et al., 2002a). So können LHC mit einem relativ hohen Chl *a/b*-Verhältnis, also einem hohen Chl *a*-Anteil (Lhcb4, Lhca1 und Lhca3), nicht ohne Chl *a*, aber sehr wohl ohne Chl *b* rekonstituiert werden. (Giuffra et al., 1996; Schmid et al., 2002a). Dagegen bilden LHC mit einem relativ hohen Chl *b*-Anteil (Lhcb1, Lhcb5, Lhca2 und Lhca4) nur bei Anwesenheit von Chl *b* stabile LHC, während Chl *a* dafür nicht notwendig ist (Plumley und Schmidt, 1987; Paulsen et al., 1990; Ros et al., 1998; Schmid et al., 2002a). Der unterschiedliche Pigmentbedarf von Lhc-Proteinen konnte auch bei Versuchen mit Mutanten mit defekter Chl *b*-Synthese beobachtet werden (White und Green, 1988; Bossman et al., 1997)

3.3 Schutz des Photosyntheseapparates vor zu hohen Lichtintensitäten

Die Lichtsammelantennen der Pflanzen sind darauf ausgelegt, die einstrahlende Sonnenenergie möglichst effizient auszunutzen. Bei zu starker Lichteinstrahlung besteht jedoch die Gefahr, dass die Kapazität des Photosyntheseapparates nicht ausreicht, um die eingefangene Energie umzusetzen, so dass es zur Bildung von reaktivem Sauerstoff und dadurch zu photooxidativen Schäden kommt (Heldt, 2003).

Die Aufgabe der in den LHC gebundenen Carotinoide (siehe A3.1) besteht deshalb zum einen in der Absorption von Licht in der Grünücke der Chl (Liu et al., 2004), zum anderen dienen sie aber auch dem Schutz des Photosyntheseapparates vor reaktivem Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2^*$) (Demmig-Adams, 1990). Werden Chl übermäßig angeregt und können die Energie nicht schnell genug weitergeben, gehen sie unter Abgabe von Wärme vom Singulett- in den Triplettzustand ($^3\text{Chl}^*$) über. Aus diesem kann Energie auf Sauerstoff übertragen werden, wodurch dieser wiederum in seinen reaktiven Singulettzustand versetzt wird. Carotinoide können ebenfalls die Energie des $^3\text{Chl}^*$ übernehmen, und diese in Form von Wärme abführen („quenchen“). Somit verhindern sie die Bildung von $^1\text{O}_2^*$ (Demmig-Adams et al., 1996). Außerdem sind Carotinoide in der Lage auch direkt von $^1\text{O}_2^*$ Energie zu übernehmen und diesen so unschädlich zu machen.

Ein weiterer Mechanismus zum Schutz vor überschüssiger Lichtenergie ist das so genannte „non-photochemical quenching“ (NPQ), ein Mechanismus, bei dem überschüssige Energie aus dem Singulett-Zustand von Chl ($^1\text{Chl}^*$) als Wärme abgegeben wird. In höheren Pflanzen ist das NPQ eng mit dem Auftreten des Xanthophyllzyklus verknüpft (Demmig-Adams, 1990). Auf diesen wird im folgenden Abschnitt zunächst eingegangen, bevor kurz einige Aspekte des NPQ beschrieben werden.

Unter dem Xanthophyllzyklus versteht man die reversible Deepoxidation von Vio zu Zeaxanthin (Zea), wobei als Intermediat Antheraxanthin (Anthera) entsteht (Yamamoto et al., 1962; Abb. 5). Die Hinreaktion des Xanthophyllzyklus wird durch die Violaxanthin-Deepoxidase (VDE) katalysiert, ein kerncodiertes luminales 43 kDa großes Enzym (Arvidsson et al., 1996, Bugos und Yamamoto, 1996) das durch die Ansäuerung des Lumens aktiviert wird und parallel zur Aktivierung an die Thylakoidmembran assoziiert (Hager und Holocher, 1994, Bratt et al., 1995). Die VDE besitzt ein pH-Optimum von 5,2 und benötigt Ascorbat und MGDG als Cofaktoren

(Hager, 1966, 1969). Als Substrat der VDE fungiert frei in der Membran vorliegendes Vio (Yamamoto und Bassi, 1996, Macko et al., 2002), was bedeutet, dass bei der Deepoxidierung von proteingebundenem Vio dessen Freisetzung aus den LHC den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Die Rückreaktion wird durch die Zeaxanthin-Epoxidase auf der stromalen Seite der Membran katalysiert (Heldt, 2003).

Ein Mass für die Aktivität des Xanthophyllzyklus ist der Deepoxidationsgrad der Xanthophyllzykluspigmente, der sich wie folgt berechnet: $DEPS = (Zea + 0,5 \times Ant)/(Zea + Ant + Vio)$

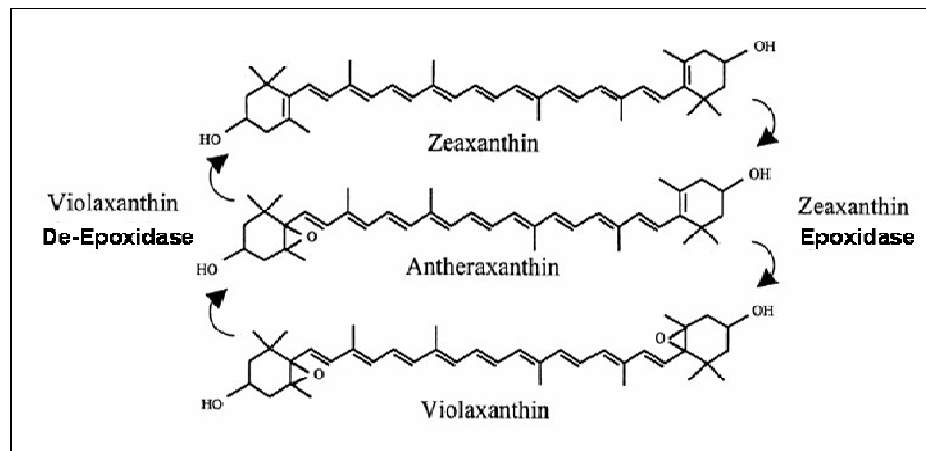


Abb. 5: Strukturformeln der am Xanthophyllzyklus beteiligten Pigmente. Die Darstellung wurde von <http://bric.postech.ac.kr> entnommen.

Das NPQ setzt sich aus drei Komponenten zusammen: qI (Photoinhibition), qT („state-transition“) und qE („high energy quenching“) (Holt et al., 2004). In höheren Pflanzen kann der qE-Anteil bis zu 80% des $^1\text{Chl}^*$ quenchen (Demmig-Adams et al., 1996; Bassi und Caffari, 2000). Die qE-Komponente des NPQ ist pH-abhängig (Horton et al., 1996), an die Anwesenheit von PsbS gebunden (Li et al., 2000) und benötigt zur vollständigen Induktion das im Xanthophyllzyklus gebildete Zea (Niyogi et al., 1998). Die genaue Rolle, die diese Komponenten bei der Induktion des qE spielen ist noch nicht verstanden. Möglicherweise wird das NPQ durch eine Proteinkonformationsänderung in pigmentbindenden Proteinen (LHC oder PsbS) induziert (möglicherweise ausgelöst durch Protonierung), durch die proteingebundene Chl in räumliche Nähe zueinander gebracht, und damit in einen „quenching“-Zustand versetzt werden, ähnlich dem, der in hochkonzentrierten Chl-Lösungen vorliegt (Horton und Ruban, 2004). Alternativ wird vorgeschlagen, dass Zea direkt als „Quencher“ fungiert, indem entweder ein Energie und/oder Elektronentransfer von $^1\text{Chl}^*$ auf Zea stattfindet (Frank et al., 1994; Ma et al., 2003). Dies wird als „direkte“ Beteiligung von Zea am NPQ bezeichnet. Möglicherweise wirkt Zea jedoch auch als allosterischer Aktivator des NPQ, indem seine Bindung in Carotinoidbindungsstellen der LHC die oben beschriebene Konformationsänderung bewirkt (Horton et al., 1991, 1996). Als Ort dieser Bindung werden die periphere V1-Bindungsstelle (Caffari et al., 2001) oder die L2-Bindungsstelle (Formaggio et al., 2001) diskutiert. Für letzteres spricht, dass Carotinoide in der L2-Bindungsstelle von LHCII reversibel ausgetauscht werden können (Bassi und Caffari, 2000). *In vitro* kann dieser Austausch durch eine pH-

Erniedrigung induziert werden (Morosinotto et al., 2002b). Allerdings reicht das Vorkommen von *Zea* alleine nicht aus, um NPQ zu induzieren. Das PsbS-Protein muß dafür zwingend vorhanden sein (Li et al., 2000). Der genaue Mechanismus wie dieses am NPQ beteiligt ist, ist allerdings noch unklar (Holt et al., 2004).

NPQ wird in der Regel mit den LHC des PSII in Verbindung gebracht, da Ähnlichkeiten zwischen NPQ und dem *in vitro*-Fluoreszenzquenching des LHCII bestehen (Horton und Ruban, 2004). Allerdings findet NPQ auch statt wenn Komponenten des LHCII wie z.B. CP26, CP29 oder der majore LHCIIb fehlen (Anderson et al., 2001, 2003), oder wenn die Gesamtmenge des LHCII verringert ist (Lokstein et al., 1993), so dass man davon ausgeht, dass die NPQ-Energiedissipation nicht unbedingt an einen bestimmten LHC gebunden ist (Horton und Ruban, 2004). Für das PSI wurde die Induktion von NPQ allerdings noch nicht beobachtet.

Auch die Beteiligung der unterschiedlichen LHCI-Proteine am Xanthophyllzyklus ist bisher noch nicht im Detail untersucht worden. In den bisher vorgenommenen Untersuchungen von *in vivo* deepoxidierten PSI-LHCI-Holokomplexen wurde für diese ein geringerer Deepoxidationsgrad als für LHCII gefunden (Thayer und Björkmann, 1992; Schäfer et al., 1994; Färber et al., 1997; Verhoeven et al., 1999). Dagegen zeigte eine *in vitro*-Deepoxidationsstudie mit r-Lhc-Proteinen aus *A. thaliana* und rekombinanter VDE eine im Vergleich zu den meisten LHCII-Komponenten (r-Lhcb1-3, r-Lhcb4) verstärkte Deepoxidation von r-Lhca1 und r-Lhca4, lediglich r-Lhcb5 wurde stärker deepoxidiert als die beiden r-Lhca (Morosinotto et al., 2002b). Allerdings war der Deepoxidierungsgrad in dieser Studie insgesamt niedriger als in einer vergleichbaren *in vitro*-Studie mit r-Lhcb1 (Jahns et al., 2001). Die Studie von Jahns und Mitarbeitern zeigte auch, dass die Deepoxidierbarkeit des im r-Lhcb1 gebundenen Vio davon abhängt in welcher der unterschiedlichen Carotinoidbindungsstellen es gebunden ist. Dabei war Vio in der L1-Stelle nicht deepoxidierbar, während in L2 und N1 gebundenes Vio deepoxidiert werden konnte, wenn auch mit unterschiedlichen Umsatzraten.

3.4 Spektroskopische Eigenschaften des LHCI

Spektroskopisch unterscheidet sich der LHCI von den LHC des PSII durch sein Fluoreszenzmaximum, das gegenüber der Fluoreszenz der LHCII-Komponenten (~ 680 nm) ins Langwellige verschoben ist (~ 730 nm) (Schmid et al., 2001). Diese langwellige Fluoreszenz geht überwiegend vom Lhca1/Lhca4-Dimer (LHCI-730) aus. Schmid et al. (1997) konnten durch Untersuchungen an rekombinanten Komplexen nachweisen, dass die langwellige Fluoreszenz überwiegend mit Lhca4 assoziiert ist, dessen Monomer ein Fluoreszenzmaximum bei 730 nm aufweist. Durch die Interaktion mit Lhca1 verstärkt sich diese langwellige Fluoreszenz, und es kommt zu einer Verschiebung des Maximums auf ~734 nm (Schmid et al., 1997, Croce et al., 2002a). Eine Chl-Population des LHCI, die bei 711 nm absorbiert und bei 730 nm fluoresziert konnte auch *in vivo* nachgewiesen werden (Ihalainen et al., 2000). In der gleichen Studie wurde eine zweite Gruppe langwelliger Chl im LHCI beschrieben, die bei 702 nm fluoresziert und den Komponenten des LHCI-680 zugeordnet wurde. Mittlerweile konnte auch in rekonstituiertem Lhca3 eine langwellige Fluoreszenzkomponente bei 720 nm nachgewiesen werden (Schmid et al., 2002a; Castelletti et al., 2003).

Untersuchungen an nur mit Chl *a* rekonstituiertem Lhca4, in denen eine verringerte langwellige Fluoreszenz beobachtet wurde, legen nahe, dass Chl *b* an der Entstehung dieser Fluoreszenz beteiligt ist (Schmid et al., 2001). Es wird vermutet, dass die langwellige Fluoreszenz von einem Chl *a/b*-Dimer herrührt. Außerdem wurde gezeigt, dass der Ligand der Chl-Bindungsstelle A5 (Nomenklatur nach Kühlbrandt et al., 1994) eine Rolle spielt (Keuchel, 2003; Morosinotto et al., 2003a). Hier befindet sich nur bei den Lhc-Proteinen mit ausgeprägter langwelliger Fluoreszenz (Lhca3 und Lhca4) ein Asparagin, in allen übrigen Lhc-Proteinen ist der Ligand ein Histidin. Die Funktion der langwelligen Fluoreszenz ist noch unklar. Möglicherweise dient sie durch Ableitung überschüssiger Energie dem Schutz vor übermäßiger Sonneneinstrahlung (Stahl et al., 1989). Dem entgegengesetzt wird aber auch eine Vergrößerung des Absorptionsquerschnitts als Funktion diskutiert (Rivadossi et al., 1999).

4. Fragestellung

Hinsichtlich ihrer Protein- und Pigmentzusammensetzung ist über die Lichtsammelantenne des PSI weniger bekannt als über die des PSII. Dies liegt an der geringeren Menge, in der die LHC des PSI in der Thylakoidmembran vorkommen und daran, dass die Isolierung des majoren LHCII deutlich leichter ist als die der LHCI-Komponenten.

Um genaueres über die Pigmentbindung des LHCI herauszufinden, sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Isolation nativer LHCI-Subkomplexe optimiert, und im Anschluß deren Pigmentstöchiometrien und Pigment/Protein-Verhältnisse bestimmt werden.

Neben der Untersuchung der Pigmentbindung von LHCI-Subpopulationen lag ein Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Untersuchung der Proteinzusammensetzung des LHCI. Grund hierfür waren Hinweise, dass der LHCI komplexer zusammengesetzt ist als bisher angenommen. So enthält das Genom höherer Pflanzen mehr *lhca*-Gene als bisher Lhca-Proteine nachgewiesen wurden. Außerdem wurde bei Proteinanalysen des PSI von Gerste und Tomate eine zusätzliche Bande im Molekulargewichtsbereich der LHCI-Proteine aufgetrennt, deren Identität noch nicht geklärt ist. Da in den letzten Jahren verbesserte Methoden zur Proteinanalytik von Membranproteinen entwickelt wurden, z.B. bei deren Auftrennung per zweidimensionaler Gelelektrophorese und ihrer massenspektrometrischen Identifizierung, und mittlerweile apoproteinspezifische Antikörper gegen LHCI-Proteine zur Verfügung stehen, sollte mit Hilfe dieser Methoden die Proteinzusammensetzung des LHCI hinsichtlich des Auftretens von Lhca-Isoformen oder zusätzlicher Lhca-Proteine untersucht werden.

Falls im Zuge dieser Proteinuntersuchungen neue potentielle Lhca-Proteine gefunden werden sollten, z.B. das Genprodukt eines der zusätzlichen *lhca*-Gene, sollte geklärt werden, ob diese Proteine tatsächlich funktionelle Lichtsammelkomplexe bilden können und somit Bestandteil der PSI-Antenne sind, und ob eine Interaktion mit anderen Lhca-Proteinen erfolgt.

Ein bisher ungeklärter struktureller Aspekt des LHCI ist das Dimerisierungsverhalten von Lhca2 und Lhca3. Native Lhca2- und Lhca3-Pigment-Protein-Komplexe lassen sich überwiegend als eine Mischfraktion aus Lhca2- und Lhca3-Monomeren isolieren. Es gibt jedoch gute Hinweise darauf, dass beide *in vivo* als Dimere vorliegen. Nachdem sich die *in vitro*-Rekonstitution auch

für die Untersuchung des Oligomerisierungsverhaltens von Lhc-Proteinen als sehr hilfreich erwiesen hat, sollte durch entsprechende *in vitro*-Rekonstitutionsversuche mit rekombinanten Lhca2- und Lhca3-Apoproteinen das Oligomerisierungsverhalten dieser Lhca-Proteine untersucht werden.

Wenig bekannt ist bisher auch über die Lokalisierung des Xanthophyllzyklus in der Antenne des PSI. Deshalb sollte ein *in vitro*-Deepoxidationssystem verwendet werden, um Aufschluss über das Deepoxidationsverhalten des in den nativen LHCI-Subfraktionen gebundenen Violaxanthins zu erlangen. Parallel dazu sollten rekonstituierte Lhca-Proteine untersucht werden, um zu sehen, ob an verschiedene Lhca-Proteine gebundenes Violaxanthin unterschiedliche Deepoxidationseigenschaften aufweist. Als Referenz zu den *in vitro*-Ergebnissen, sollte zusätzlich der Deepoxidationsgrad von *in vivo* durch Starklicht deepoxidiertem LHCI bestimmt werden.

B Material

1. Chemikalien

Chemikalien wurden von den Firmen Bio-Rad (München), Difco (Otto Nordwald KG, Hamburg), ICN Biomedicals (Eschwege), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Die Isolation von Plasmiden wurde mit Kits der Firmen Macherey-Nagel (Düren) und Promega (Mannheim) durchgeführt. Zur DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen wurde ein Kit der Firma Peqlab (Erlangen) verwendet. Primer wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

2. Geräte

Allgemeine Geräte

<u>Magnetrührer:</u>	Ikamag [®] RCT, JKA-Labortechnik (Staufen) Heidolph [®] MR 3001 K8, Heidolph Elektro (Kehlheim)
<u>Mischer für Reaktionsgefäße:</u>	Vortex-Genie 2 (G-560E), Scientific Industries (New York, USA)
<u>Photometer:</u>	U-2000 Spektrophotometer, Hitachi (Tokyo, Japan)
<u>Scanner:</u>	Canoscan 3200F, Canon (Amsterdam, Niederlande)
<u>Spannungsquellen:</u>	Biometra [®] Standard Power Pack P25, Biometra (Göttingen) Power Pack 300, Bio-Rad (Herkules, USA)
<u>Ultraschallbad:</u>	T 460, Elma [®] Transsonic (Singen/Hohentwiel)
<u>Ultraturax:</u>	Ultraturax T500, IKA-Labortechnik (Staufen)
<u>Waagen:</u>	Analysenwaage A200S, Sartorius (Göttingen) Präzisionswaage GS-3200-2, Gottl. Kern & Sohn [®] (Albstadt)
<u>Zentrifugen:</u>	
Kühlzentrifugen:	BR4i, Jouan (Unterhaching); Rotoren: AB1.14, AB50.10 J2HS, Beckmann (München); Rotor: JLA10.500, JA20 Avanti 3-25, Beckmann (München); Rotor: JA25.50, JA25.15
Tischzentrifugen:	Micro 24-48 (Typ 1001), Hettich (Tuttlingen) Microliter (Typ 2020), Hettich (Tuttlingen)
Ultrazentrifugen:	Centrikon T-1070, Kontron (Neufahrn) Centrikon T-1065, Kontron (Neufahrn) Rotoren: TST28, TST41.14, TFT70.38 Optima XL-80K, Beckmann (München) Optima XL-100K, Beckmann (München) Rotoren: SW 28, SW40Ti, SW41Ti, SW60Ti, Ti80

Geräte für mikrobiologische Arbeiten

<u>Autoklav:</u>	Varioklav Dampfsterilisator (Typ 500), H&P Labortechnik (Fachhandel, Labotec, Wiesbaden)
<u>Brutschränke:</u>	BE 400, Memmert (Schwabach) BE 500, Memmert (Schwabach)
<u>Inkubationsschüttler:</u>	TH 15 Inkubationshaube mit KS 15 A Kompaktschüttler, E. Bühler (Hechingen)
<u>Kulturrad:</u>	Rotator, Helmut Saur Laborbedarf (Reutlingen)
<u>Sterilbank:</u>	Horizontal Laminar Flow Workstation, Microflow, MDH (Hampshire, UK)

Geräte für molekularbiologische Arbeiten

<u>Geldokumentationsanlage:</u>	GelDoc™ 1000 Single Wavelength Mini-Transilluminator, Bio-Rad (München)
Software:	Molecular Analyst, Bio-Rad (München)
<u>Heizblock:</u>	Techne Dri-Block® DB-2D, Techne (Cambridge, UK)
<u>Speed Vac (Vakuumentrifuge):</u>	Vacuum Concentrator Mini-30, Bachofer (Reutlingen)
<u>Thermocycler:</u>	Genius-02 T, Techne (Cambridge, UK) Primus 25/96, MWG-Biotech (Ebersberg)
<u>UV-Lampe:</u>	Handlampe mit 254 nm und 312 nm Einstellung, Helmut Saur Laborbedarf (Reutlingen)

Geräte für biochemische und biophysikalische Arbeiten

<u>Digitalkamera:</u>	C-3040 Zoom, Olympus Optical Co. GmbH (Hamburg)
<u>Durchflussthermostat:</u>	Ministat kompatibel control, Huber (Offenburg)
<u>Elektrophoresekammern:</u>	Hoefer® Mighty Small®, Hoefer Pharmacia (San Francisco, CA, USA) Maxigel-Elektrophoresesystem (Biometra, Göttingen) Protean-Multicell (BioRad, München)
<u>Elektroblotter:</u>	PerfectBlue™ Semi-Dry-Electroblotter (PeqLab, Erlangen)
<u>Fluoreszenzspektrometer:</u>	Fluoromax-3, ISA Jobin Yvon-Spex (Grasbrunn); Software: Datamax, Version 2.20, AISN, Jobin Yvon-Spex (Grasbrunn)
<u>Gelgießapparatur:</u>	Hoefer® Multiple Gel Caster, Hoefer Pharmacia (San Francisco, CA, USA)
<u>Gelschüttler:</u>	Heidolph Rotamax 120T, Heidolph Elektro GmbH & Co KG (Kelheim)
<u>Gradientenmischer:</u>	Gradient Former Model 385 (BioRad, München)
<u>HPLC (analytisch):</u>	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH (Groß-Umstadt)
Degasser:	Gastorr 154
Gradientenmischer:	LG-1580-04
Pumpe :	PU-1580
Detektor:	Diode Array Detector MD-1515
Säule:	Chromolith Speed-Rod, RP 18E, Nr.1.51450.0001, l = 50 mm; d=4.6 mm, Merck (Darmstadt)
Software	Borwin-PDA, Ver. 1.50

<u>Isoelektrische Fokussierung:</u>	Ettan IPGphor-System (Amersham, Freiburg)
<u>Kocher:</u>	HB4 basic Heizbad, IKA-Labortechnik (Staufen)
<u>Massenspektrometrie:</u>	
Probensammler:	Famos 48-well Autosampler (LC-Packings, Amsterdam, NL)
Pumpe:	Ultimate Micropump (LC-Packings, Amsterdam, NL)
Säule:	LC-Packings PepMap C ₁₈ , NAN-75-15-03-PM, l = 150 mm, d = 75 µm (LC-Packings, Amsterdam, NL)
Interface:	Fused Silica Needle, FS 360-75-30 (New Objective, Woburne, Mass., USA)
Massenspektrometer:	LCQ Deca XP Iontrap Mass-spectrometer (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA)
Software:	Finnigan Sequest/Turbo Sequest (revision 2.0, ThermoQuest, San Jose, CA, USA)

3. Computerprogramme und Datenbanken

BLAST-Suche :

NCBI-Datenbank (EST und genomisch) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST>

Alignments:

GENESTREAM network server IGH <http://www2.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>

GeneDoc <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>

Tomaten-EST/Gen-Datenbank:

Solanaceae Genomics Network (Cornell University) <http://www.sgn.cornell.edu>

Tomato gene index (The institute for Genomic Research) <http://www.tigr.org/tdb/tgi/lgi>

DNA → AS-Übersetzung, theoretische M_r und pI:

Expasy-tools <http://www.expasy.org/tools>

Bestimmung von Transitsequenzen:

TargetP <http://www.cbs.dtu.dk/services/targetP>

4. Bakterienstamm und Expressionsplasmide

Zur Überexpression von Proteinen wurde der folgende *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm verwendet:

JM 101: supE, thi-1, Δ(lac-proAB)[F' traD36, proAB, lacI^q, ZΔM15] (Stratagene, Heidelberg)

Es standen kompetente, d.h. zur Aufnahme von Plasmid-DNA befähigte JM101-Zellen aus dem Laborbestand zur Verfügung.

Zur Expression der Lhca-Apoproteine wurde ein Vektor der pDS 12/RBSII-Reihe verwendet (Abb. 6, Bujard et al., 1987), in den *lhca*-Gene eingefügt wurden. 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 verleiht dadurch transformierten Zellen Ampicillinresistenz.

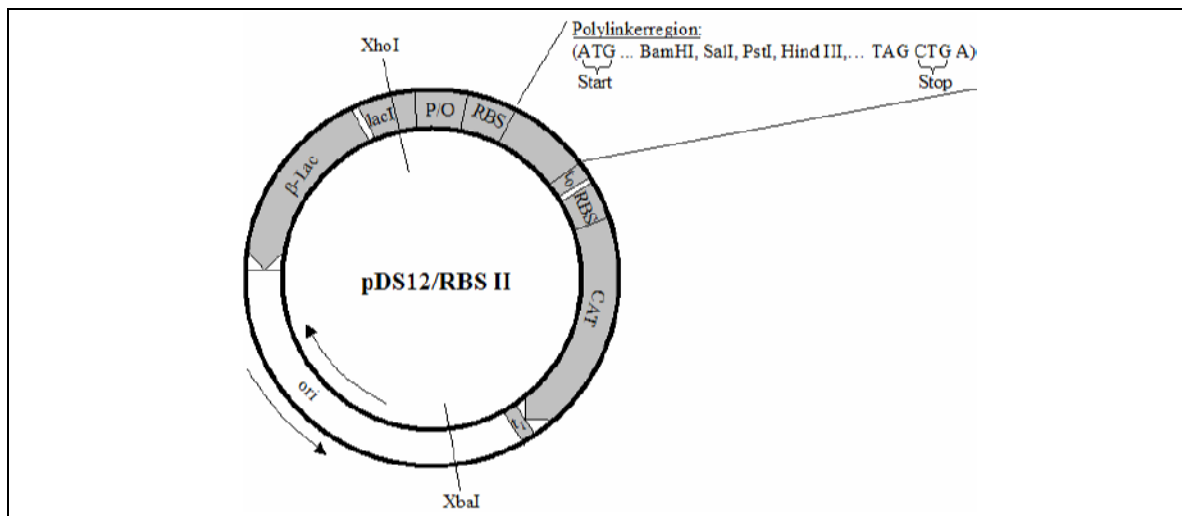


Abb. 6: Darstellung des pDS12/RBS II-Vektors. β -Lac, β -Lactamase; lacI, lac-Repressor; P/O, T₅-Promotor (P_{N25}) und Lac-Operon; t₀, t₁, Terminationsregionen; RBS, Ribosomenbindungsstelle; CAT, Chloramphenicol-Acetyltransferase; ori, Replikationsursprung.

Expressionsplasmide mit in die Polylinkerregion (Abb. 7) inserierten *Lycopersicon esculentum* (Tomaten)-*lhca1*-, *lhca2*-, *lhca3*- und *lhca4*-Wildtyp-Genen wurden freundlicherweise von J. Rupprecht (*lhca1* und *lhca4*), M. Wiener (*lhca3*) und S. Potthast (*lhca2*) (alle Universität Mainz) zur Verfügung gestellt. Die Herstellung dieser Konstrukte wird in Rupprecht (2002), Wiener (2001) und Potthast (2002) beschrieben. Die Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen für Lhca1-4 befinden sich im Anhang.

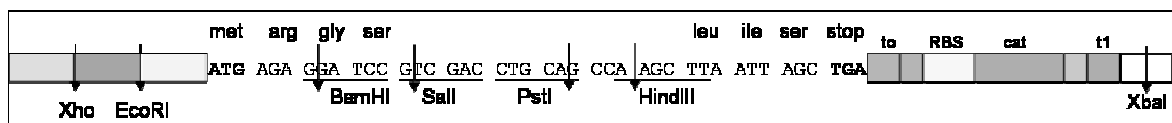


Abb. 7: Polylinkerregion des pDS-12-Expressionsplasmids

5. Pflanzenanzucht

Native Pigment-Protein-Komplexe und die zur Rekonstitution verwendeten Pigmente (Kap. C2.1) wurden aus Tomatenpflanzen (*Lycopersicon esculentum*) der Sorte Hellfrucht (Gartenland GmbH, Aschersleben) isoliert. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus auf Vermiculit bei 22 °C unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) bei einer Lichtintensität von $\sim 120 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$, die durch Leuchtstoffröhren (L 58W/11-860 LumiluxPlusEco, Osram, München) erzeugt wurde, vier bis sechs Wochen angezogen, wobei einmal die Woche mit Algoflash-Tomatendünger (Algochimie, Chateau-Renault, Frankreich) gedüngt wurde.

C Methoden

In dieser Arbeit wurden sowohl aus Tomatenpflanzen isolierte native Pigment-Protein-Komplexe als auch *in vitro* aus bakteriell überexprimiertem Apoprotein und isolierten Pigmenten rekonstituierte Pigment-Protein-Komplexe untersucht. Im Folgenden wird für beide Untersuchungsobjekte beschrieben wie sie isoliert bzw. hergestellt wurden.

1. Isolierung nativer Pigment-Protein-Komplexe

1.1 Thylakoidisolierung

Thylakoidpräparationen dienten als Ausgangsmaterial zur Isolation von Pigment-Proteinkomplexen (Kap. C1.2, C1.3). Bei der Präparation wurde zügig, gekühlt (auf Eis) und abgedunkelt gearbeitet.

Von vier bis sechs Wochen alten Tomatenpflanzen (Kap. B5) wurde das obere Pflanzendrittel mit einer Schere abgeschnitten und mit eiskalter Homogenisierungslösung (0,4 M Sorbitol, 0,1 M Tricine/NaOH (pH 7,8)) versetzt, im Ultraturax zerkleinert und über vier Lagen Miracloth filtriert, um grobe Rückstände zu entfernen. Dann folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 3000 x g, die dazu diente die Chloroplasten zu pelletieren. Durch die anschließende Resuspension des Pellets in Breaklösung (50 mM Sorbitol, 10 mM Tricine/NaOH (pH 7,8), 5 mM EDTA/NaOH (pH 7,8)) wurden die Chloroplasten aufgebrochen. Das nach erneuter Zentrifugation (10 min, > 10000 x g) entstandene Pellet enthielt Thylakoidmembranen. Es wurde in Thylakoidsuspensionslösung (30% (w/v) Saccharose, 10 mM Tricine/NaOH (pH 7,8), 1 mM EDTA/NaOH (pH 7,8)) resuspendiert und die Chl-Konzentration der Suspension photometrisch bestimmt (Kap. C3.1). Nach Einstellen der Chl-Konzentration auf ~2 mg/ml, wurden die Präparationen bei -70°C eingefroren und gelagert.

1.2 PSI-Isolierung

Zur Isolierung des PSI-LHCI-Holokomplexes wurde eine Thylakoidsuspension (Kap. C1.1) entsprechend 30 mg Chl mehrmals gewaschen, um möglichst viele nichtintegrale Membranproteine zu entfernen. Dazu wurde die Thylakoidsuspension zunächst mit Breaklösung (50 mM Sorbitol, 10 mM Tricine/NaOH (pH 7,8), 5 mM EDTA/NaOH (pH 7,8)) auf eine Konzentration von 0,4 mg Chl/ml eingestellt und für 10 min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in Breaklösung wiederum zu einer Konzentration von 0,4 mg Chl/ml resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Die gewaschenen Thylakoide wurden mit dest. H₂O auf eine Konzentration von 0,8 mg Chl/ml eingestellt und durch Zugabe von 20% (v/v) Triton X-100 zu einer Endkonzentration von 0,5% (v/v) solubilisiert. Dies erfolgte durch 30-minütiges Rühren bei RT im Dunkeln. Nicht solubilisierte Thylakoidfragmente wurden durch Zentrifugation bei 42000 x g und 4 °C für 30 min pelletiert. Die weitere Aufreinigung erfolgte über SDG-UZ. Die verwendeten SDG mit einem Volumen von 32 ml und einer Saccharosekonzentration von 0,09-0,7 M wurden durch Einfrieren bei -20 °C und langsames Auftauen (bei 4 °C) einer Lösung aus 0,35 M Saccharose,

0,05% (v/v) Triton X-100 und 5 mM Tricine/NaOH (pH 7,8) hergestellt. Es wurden jeweils 4 - 4,5 ml des Überstandes auf einen SDG aufgetragen, von dem zuvor die obersten 4 ml abgenommen wurden. Die anschließende UZ wurde bei 25000 Upm im SW 28- bzw. TST 28-Rotor (~112500 x g) für 22-25 h durchgeführt. Nach Beendigung der Zentrifugation wurden die PSI enthaltende Bande (unterste pigmentierte Bande) abgezogen, mit dem sechsfachen Volumen an kaltem dest. H₂O versetzt und erneut für 16-18 h im TST 70.38-Rotor bei 50000 Upm (258000 x g) zentrifugiert. Dadurch wurde der PSI-Holokomplex pelletiert und konnte in Thylakoidsuspensionslösung auf eine Konzentration von 1,5-2 mg Chl/ml (Kap. C3.1) resuspendiert werden. Die Aufbewahrung erfolgte eingefroren bei -70°C.

1.3 LHCI-Isolierung

Zur Isolation der LHCI-Subfraktionen LHCI-730 und LHCI-680 wurde eine PSI-Holokomplex Präparation (Kap. C1.2) nochmals mit dem vierfachen Volumen dest. H₂O gewaschen (Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 42000 x g), um Saccharose zu entfernen. Das resultierende Pellet wurde in 5 mM Tris/HCl (pH 7,5) auf eine Konzentration von 0,5 mg Chl/ml (Kap. C3.1) aufgenommen. Zur Solubilisierung wurde die Probe auf eine Endkonzentration von 0,2% (w/v) Zwittergent 3-16 (ZW16), 1% (w/v) n-Octyl β-D-Glucopyranosid (OG) und 1% (w/v) n-Dodecyl β-D-Maltosid (β-DM) eingestellt. Dafür wurde ZW-16 als Feststoff eingewogen, die Probe zugegeben und zunächst für 10 min bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 10% (w/v) OG und 10% (w/v) β-DM zu einer Endkonzentration von jeweils 1% (w/v). Im Anschluß wurde die Probe für 60 min bei 4°C drehend inkubiert. Die weitere Aufreinigung erfolgte über SDG-UZ. Es wurden SDG mit einem Volumen von 11 ml und einer Saccharosekonzentration von 0,09-1 M verwendet, die durch Einfrieren bei -20 °C und langsames Auftauen (bei 4 °C) einer Lösung aus 0,5 M Saccharose, 0,1% (w/v) β-DM und 5 mM Tricine/NaOH (pH 7,8) hergestellt wurden. Vor dem Probenauftrag wurde jeweils der oberste Milliliter der Gradienten abgenommen. Pro Gradient wurde ein Aliquot entsprechend 250 bis 500 µg Chl aufgetragen und für 22-24 h bei 4 °C im SW 41Ti-Rotor (alternativ: SW 40Ti oder TST 41.14) mit 37000 Upm (~246000 x g) zentrifugiert. Die im Anschluß an die Zentrifugation abgezogenen LHCI-Banden wurden entweder direkt charakterisiert oder falls nötig in Y10-Centrikons (Ausschlußgröße 10 kDa; Millipore, Eschborn) aufkonzentriert und bei -70°C gelagert.

1.4 Bestimmung der Pigment/Protein-Stöchiometrie nativer LHCI- Subfraktionen

Zur Bestimmung ihrer Pigment/Protein-Stöchiometrie wurden per SDG-UZ isolierte LHCI-680 und LHCI-730 Fraktionen weiter aufgereinigt, um Saccharose und Detergenzien zu entfernen, da diese bei der Proteinquantifizierung stören würden. Dazu wurden die entsprechenden Banden aus dem SDG abgezogen, mit dem zwanzigfachen Volumen an 2 mM Tricine/NaOH (pH 7,8) versetzt, für 18 h bei 70000 Upm im Ti80-Rotor (602000 x g) pelletiert und in einem kleinen Volumen des Überstandes resuspendiert. Von den aufgereinigten LHCI-Fraktionen wurde anschließend photometrisch die Chl-Konzentration bestimmt (Kap. C3.1), um Aliquots mit gleicher Chl-Menge für die Analyse der Pigmentzusammensetzung per HPLC (Kap. C3.3) und zur Proteinanalyse mittels der BCA-Methode (Kap. C3.4.2) entnehmen zu können. Die Proteinkonzentration der Probe wurde auf die Molmasse umgerechnet. Da beide LHCI-Subfraktionen zwei unterschiedliche Apoproteine enthalten wurde für LHCI-680 der Mittelwert

aus den Molekularmassen von Lhca2 und Lhca3 (23,5 kDa) bzw. für LHCI-730, der Mittelwert von Lhca1 und Lhca4 (21,5 kDa) verwendet. Die ermittelte Chl-Konzentration wurde ebenfalls in molare Mengen umgerechnet (Chl *a* = 893,5 g/mol, Chl *b* = 907,5 g/mol). Aus diesen Angaben wurden unter Einbeziehung der per HPLC (Kap. C3.3) ermittelten Pigmentstöchiometrien für LHCI-680 und LHCI-730 die Pigmentmengen pro Apoprotein berechnet.

2. Herstellung rekonstituierter Lichtsammelkomplexe

Aus isolierten Pigmenten und überexprimiertem Apoprotein lassen sich mittels Detergenswechselrekonstitution *in vitro* Lichtsammelkomplexe zusammensetzen, die nativen LHC gleichen (Paulsen et al., 1993). In dieser Arbeit wurden Rekonstitutionen der LHCI-Proteine Lhca1 bis Lhca5 durchgeführt. Für Lhca1 bis Lhca4 standen bereits fertige Expressionsplasmide (Kap. B4) zur Verfügung, für Lhca5 mussten diese erst hergestellt werden.

2.1 Zur Rekonstitution verwendete Pigmentmischungen

Die zur LHC-Rekonstitution verwendeten Pigmente, sowohl Gesamtpigmentextrakt (Totalextrakt, TE) als auch Einzelpigmente (Chl *a*, Chl *b*, Lut, Vio, β -Car, Neo) wurden von M. Wiener, J. Rupprecht und D. Corbet (AG Schmid, Institut für Allgemeine Botanik, Universität Mainz) zur Verfügung gestellt, und waren aus ca. vier Wochen alten Tomatenblättern der Sorte *Polaris F1-Hybrid* (Samen Barnsdorf, Mainz) oder *Hellfrucht* (Gartenland GmbH, Aschersleben) isoliert worden.

Im Allgemeinen wurden die Rekonstitutionen mit TE durchgeführt. Zur Ermittlung des Pigmentbedarfs von Lhca5 (Kap. D5.4) und zur Herstellung von r-LHC mit Vio und Lut als einzigen Carotinoiden für die Deepoxidierungsexperimente (Kap. C3.7.2) wurden jedoch aus Einzelpigmenten Pigmentmischungen mit definierten Pigmentstöchiometrien hergestellt. Die Zusammensetzung der verwendeten Pigmentmischungen ist bei den jeweiligen Versuchen angegeben. Zur Herstellung dieser Pigmentmischungen wurden eingetrocknete Pigmentaliquots entweder in 100% Ethanol (Vio, Lut) oder in 100% Aceton (Chl *a*, *b*, β -Car) aufgenommen. Dann wurde zunächst die gewünschte Menge an Vio und Lut entnommen und zusammengegeben. Die Mischung wurde unter N₂ eingetrocknet, nachfolgend die gewünschte Menge an Chl *a* und Chl *b* zugegeben und erneut unter N₂ eingetrocknet. Die getrockneten Pigmente wurden bei -20 °C aufbewahrt.

2.2 Herstellung von *lhca5*-Expressionsplasmiden

pDS12/RBS II-Vektor-Konstrukte zur Überexpression von Lhca5 mußten neu hergestellt werden. Die cDNA-Sequenz des *lhca5* von *Lycopersicon esculentum* wurde aus EST-Klonen (GenBank Acc. Nr.: AW041324 (= cDNA-Klon cLET12N21) und AI778223 (= cDNA-Klon cLET39J20), beide bezogen vom Clemson University Genomics Institute, Clemson, NC, USA), amplifiziert, und über die *Sal I*- und *Hind III*-Schnittstellen in die Polylinkerregion des Expressionsplasmids (Kap. B4, Abb. 7) ligiert. Ein Lhca5-cDNA-EST-Klon (17709T7, GenBank Acc. Nr.: AF134121, Vektor: pZL) mit der *lhca5*-Sequenz von *A. thaliana* wurde freundlicherweise von S. Jansson (Umeå Plant Science Centre, University of Umeå, Schweden) zur Verfügung gestellt. Die Umklonierung in das Expressionsplasmid erfolgte in diesem Fall über die *Sal I* und *Pst I*-Schnittstellen. Die Restriktionsschnittstellen wurden an die zu klonierende

Sequenz angefügt, indem zu deren Amplifizierung Primer verwendet wurden, die die gewünschte Schnittstelle enthielten (Tab. 5, Kap. C2.2.4). Die Lhca5-Nukleotid- und AS-Sequenzen befinden sich im Anhang.

Während der Bakterienanzucht (Kap. C2.2.1) und der Herstellung von Dauerkulturen (Kap. C2.2.2) wurde steril gearbeitet. Nährböden, Gebrauchslösungen, Glas- und Plastikgefäße wurden vor der Benutzung durch Dampfsterilisation im Autoklaven bei 121 °C für mindestens 20 min sterilisiert, um Keime, Sporen und vegetative Zellen von Mikroorganismen abzutöten.

2.2.1 Bakterienanzucht

Bakterien wurden in Luria Bertani-Medium (LB-Medium; 1% (w/v) Trypton, 1% (w/v) NaCl, 0,5% (w/v) Hefeextrakt; einstellen mit NaOH auf pH 7,5) in Anwesenheit des Selektions-Antibiotikums Ampicillin (100 µg/ml, Zugabe nach Abkühlung des Mediums auf 50 °C) angezogen. Zur Plasmid- oder Proteinisolierung wurden Flüssigkulturen verwendet (Inkubation bei 37 °C und 175 Upm), während zum Vereinzeln von Kolonien Zellsuspensionen auf Agarplatten (LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin plus 1,5% (w/v) Agar) ausgestrichen wurden.

2.2.2 Herstellung von Dauerkulturen

Um Bakterien, die ein Plasmid enthalten, für längere Zeit lagern zu können, wurden Dauerkulturen hergestellt. Dazu wurde aus einer 5 ml LB-Amp-Übernachtkultur (üN-Kultur) 1 ml entnommen und mit 220 µl 80%igem Glycerin (v/v) gemischt (nicht vortexen). Das Glycerin verhindert, dass sich beim Einfrieren bei -70 °C Eiskristalle bilden, durch die die Bakterienzellen geschädigt werden.

2.2.3 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese in Agarosegelen ist eine Standardmethode zur Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA. Nukleinsäuren sind über einen großen pH-Bereich hinweg negativ geladen, weshalb DNA-Fragmente im elektrischen Feld in Richtung Anode wandern. Masse und Ladung der DNA-Fragmente sind bei einem pH>5 zueinander proportional, so dass die Laufstrecke im Gel von der Größe des Fragments abhängt, wodurch sich unterschiedlich große Fragmente voneinander trennen lassen. Die verwendete Agarosekonzentration hängt dabei von der Größe der zu erwartenden Fragmente ab: je kleiner die Fragmente desto höher die Agarosekonzentration. In dieser Arbeit wurden für Fragmente, die größer als 1500 bp waren Gele mit 0,8% (w/v) Agarose und für solche mit weniger als 1500 bp Gele mit 1,5% (w/v) Agarose verwendet (Sambrook und Russell, 2001).

Die Proben wurden vor dem Lauf mit 0,1 Volumen Probenpuffer (20% (w/v) Ficoll 400, 0,1 M EDTA/NaOH (pH 8,0), 1% (w/v) SDS, 0,25% (w/v) Bromphenolblau) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in Agarosegelen mit einer maximalen Trennstrecke von 6 cm in einer horizontalen Laufkammer bei konstant 100 V. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 2 mM EDTA, konz. Essigsäure, pH 8,5) verwendet. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel zunächst unter Schütteln in einem Ethidiumbromid-Färbepad (1 µg/ml Ethidiumbromid) für 5 min angefärbt und dann durch Waschen mit dest. H₂O unspezifische Färbungen entfernt. Dokumentation und Auswertung der Gele erfolgte mit der Geldokumentationsanlage

Gel Doc 1000 (BioRad, München) und der mitgelieferten Software „Molecular Analyst“. Als Größen- und Konzentrationsvergleich dienten die in Abb. 8 dargestellten Längenstandards, die in definierter Menge (jeweils 500 ng) mit auf das Gel aufgetragen wurden.

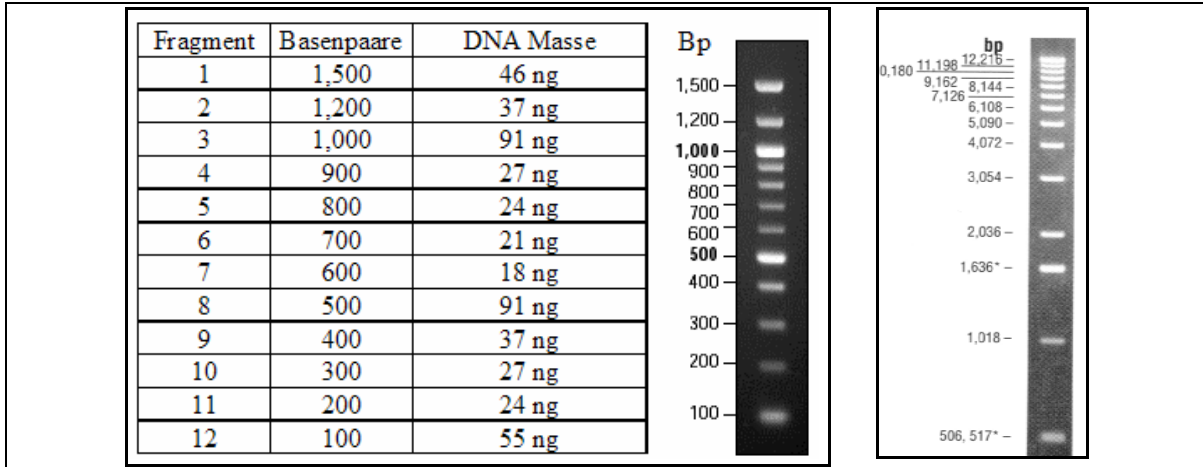


Abb. 8: Marker zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen in Agarosegelen. Gezeigt sind der 100 bp-Marker von NEB (links mit Tabelle) und der 1 kbp-Standard von Gibco BRL Life Technologies (rechts) nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel. Eine zusätzliche Bestimmung der DNA-Konzentrationen war beim 100 bp-Marker über die Bandenintensitäten möglich (siehe Tabelle).

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

PCR-Reaktionen wurden verwendet, um DNA-Sequenzen aus einem Klonierungsvektor in ein Expressionsplasmid umzuklonieren, oder um zu überprüfen, ob Bakterienkolonien das gewünschte Plasmid aufgenommen hatten.

Klonierungs-PCR

Zum Umklonieren von DNA-Sequenzen, wurden Primer (Tab. 5) verwendet, durch die sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende der Insert-DNA-Sequenz neue Schnittstellen angehängt wurden, über die das Amplifikat in das Expressionsplasmid (Kap. B4) ligiert werden konnte. Ein Standard-PCR-Ansatz von 50 µl enthielt 25 ng Plasmid-DNA, 250 ng je Primer, je 0,8 mM dNTPs und 2,5 U Polymerase (Pfu-DNA-Polymerase, Stratagene, La Jolla, CA, USA oder Pwo-DNA-Polymerase, Peqlab, Erlangen) in dem entsprechenden 1 x Polymerasepuffer. Die Amplifikation wurde mit dem in Tab. 6 aufgeführten Programm durchgeführt.

Kolonie-PCR

Wenn parallel möglichst viele Kolonien einer Transformationsplatte auf das Vorhandensein der gewünschten DNA-Sequenz untersucht werden sollten, konnte eine sogenannte Kolonie-PCR durchgeführt werden. Dazu wurde mit einer sterilen Pipettenspitze eine Kolonie gepickt und die Spitze in ein Eppendorfggefäß eingetaucht, das einen PCR-Premix mit für die Herstellung des jeweiligen Klons verwendeten Primern enthielt. Es wurden PCR-Ansätze mit einem Volumen von 25 µl verwendet, die in ihrer Zusammensetzung dem Ansatz für eine Klonierungs-PCR entsprachen.

Tab. 5: In dieser Arbeit verwendete PCR-Primer. Angegeben ist der Name des Primers, seine Sequenz in 5'→3'-Richtung, die eingebaute Schnittstelle (in der Sequenz unterstrichen) und die Art des generierten Proteins. tom, Tomate; AS, Aminosäure; pre, precursor; for, fw, forward; sal, Sal I; mat, matur; a5, Lhca5; rev, revers; At, *A. th. Arabidopsis thaliana*; oAm, ohne amber Stopp-Codon; fett, Stopp-Codons; 1) Jansson (1999); 2) Ganeteg et al. (2004).

Primer	Spezifität	Sequenz 5' - 3'	Schnittstelle
Lhca5 <i>Lycopersicon esculentum</i>			
3'tom-a5 (rev)	C-Terminus Lhca5 tom	CTAATTA <u>AAGCTTT</u> CAAGAACTCGATGCAGCAATGG	Hind III
a5-pre-for-sal-tom	N-Terminus Lhca5 tom "precursor"-Form	TGAGAG <u>TGCACAT</u> GGAGATTGCAGTGGGTAG	Sal I
a5-for-mat-sal-tom	N-Terminus Lhca5 tom mature Form nach 1)	TGAGAG <u>TGCACGCT</u> AGAAAAGGACATTCTCTAAC	Sal I
fw1	N-Terminus Lhca5 tom mature Form nach 2)	TGAGAG <u>TGCACGCT</u> CACCAAAGGCCAACATGGC	Sal I
fw2	N-Terminus Lhca5 tom mature Form nach 2) minus 4 AS	TGAGAG <u>TGCACCCA</u> ACATGGCTTCTGGCCTTG	Sal I
fw3	N-Terminus Lhca5 tom mature Form nach 2) minus 7 AS	TGAGAG <u>TGCACCTT</u> CTGGCCTTGACCCTCCAC	Sal I
fw4	N-Terminus Lhca5 tom mature Form nach 1); AS 1-4 aus <i>A. th.</i>	TGAGAG <u>TGCACGCG</u> CAGGAGGAGGCCATTCTCTAAC ACCTCTGGCTCCAGCTCAC	Sal I
Lhca5 <i>Arabidopsis thaliana</i>			
a5-rev-PstI-At	C-Terminus Lhca5 <i>A. th.</i>	AATTCTGCAG <u>CTA</u> AGATGTAGAGGTGAAGAGGG	Pst I
a5-rev-PstI-At-oAm	C-Terminus Lhca5 <i>A. th.</i> ohne amber Stopp-Codon	AATTCTGCAG <u>TTA</u> AGATGTAGAGGTGAAGAGGG	Pst I
a5-pre-for-sal-At	N-Terminus Lhca5 <i>A. th.</i> precursor Form	TGAGAG <u>TGCACAT</u> GGCCGTAGTTTACGTGG	Sal I
a5-mat-for-sal-At	N-Terminus Lhca5 <i>A. th.</i> mature Form nach 1)	TGAGAG <u>TGCACGCG</u> CAGGAGGAGGCATCAACCC	Sal I
a5-At-mat-for-SalI-MS	N-Terminus Lhca5 <i>A. th.</i> mature Form nach 1) minus 19 AS	TGAGAG <u>TGCACCTAC</u> CTGGACTAAACCCTCC	Sal I

Tab. 6: Thermocycler-Protokoll für Klonierungs- und Kolonie-PCR

Protokoll			
Schritte	Zyklenzahl	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1	1	96	300
2	33	96	60
		55	120
3	1	72	120
		72	180
4	1	4	∞

2.2.5 DNA-Aufreinigung

2.2.5.1 Isopropanolfällung

Eine schnelle und effiziente Methode, um gelöste DNA von Puffern und Salzen und Primern abzutrennen, ist die DNA-Fällung mit Isopropanol. Durch die Zugabe des Alkohols und des Salzes wird der DNA das Wasser entzogen, so dass sie ausfällt und pelletiert werden kann. Dazu wurde die zu fällende Lösung mit ddH₂O auf 150 µl aufgefüllt und mit 150 µl 4 M Ammoniumacetat und 300 µl Isopropanol gemischt. Danach wurde für 45 min bei 4 °C und 16000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das entstandene DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol (v/v) gewaschen (10 min, 4 °C, 16000 x g), um anhaftendes Salz zu entfernen. Die gefällte DNA wurde für 10 min in der Speed Vac getrocknet und im Anschluß in 10 µl ddH₂O aufgenommen.

2.2.5.2 Gelelution

Eine weitere Methode, DNA aufzureinigen und gleichzeitig ihre Qualität zu prüfen, ist die Aufreinigung mittels Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Extraktion der DNA aus dem Gel. Diese Methode wurde in dieser Arbeit für PCR-Produkte und geschnittene Vektoren verwendet. Das gewünschte Fragment wurde unter UV-Licht zügig mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein Eppendorfgefäß überführt und mit Hilfe eines Gelelutions-Kits (E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit, Peqlab, Erlangen) nach den Angaben des Herstellers aus dem Gel eluiert. Die Aufnahme der extrahierten DNA erfolgte in 30 µl ddH₂O.

2.2.6 Restriktionsverdau

Ein Restriktionsverdau wurde durchgeführt, um isolierte Plasmide auf das Vorhandensein des Inserts zu untersuchen, oder um Insert und Vektor für die Ligation vorzubereiten. Restriktionsenzyme wurden von den Firmen NEB (Schwalbach), Pharmacia (Freiburg) und Fermentas (St-Leon-Rot) bezogen (Tab. 7). Der DNA-Verdau wurde nach Vorschrift des Herstellers in den mitgelieferten Puffern durchgeführt. Es wurden pro 1 µg DNA 4-5 U Enzym eingesetzt. Der Verdau wurde für mindestens 3 h, meist jedoch üN, bei 37 °C durchgeführt. Bei einem Doppelverdau wurde der laut Herstellerangabe optimale Puffer verwendet.

Tab. 7: In dieser Arbeit verwendete Restriktionsenzyme mit Herstellerangabe. Das Temperaturoptimum lag bei allen Enzymen bei 37°C.

Enzym	Hersteller	Erkennungssequenz
Hind III	NEB	AAGCTT
Pst I	Fermentas	CTGCAG
	Pharmacia	
Sal I	Fermentas	GTCGAC
	Pharmacia	

2.2.7 Ligation

Das amplifizierte und mit den gewünschten Restriktionsenzymen geschnittene PCR-Produkt (= Insert) wurde per Isopropanolfällung aufgereinigt (Kap. C2.2.5.1) und mittels Agarose-Gelelektrophorese quantifiziert (Kap. C2.2.3). Dann erfolgte die Ligation in das mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittene Expressionsplasmid (= Vektor). Der Ligationsansatz enthielt in einem Volumen von 10 µl T4-Puffer, 1 µl (400 U) T4-Ligase (NEB, Frankfurt) und eine Gesamt-DNA Menge von 100 ng, wobei das molare Verhältnis von Insert zu Vektor etwa 3:1 betrug. Die Ligation erfolgte für 3 h bei 16 °C oder über Nacht bei 4 °C. Alternativ zu dieser „normalen“ Ligation wurde das „rapid ligation-Kit“ (Fermentas, St.Leon-Rot) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.8 Transformation

Unter Transformation versteht man die Aufnahme von Fremdplasmiden durch dafür kompetente Bakterien. Zur Transformation in JM101-Zellen (Kap. B4) wurden 2,5 µl DNA-Lösung eines 10 µl Ligationsansatz (Kap. C2.2.7) zu 50 µl aufgetauten kompetenten Zellen gegeben und durch leichtes „Anstupsen“ gemischt. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend einem 5-minütigen Hitzeschock bei 22 °C ausgesetzt. Danach erfolgte die Zugabe von 225 µl vorgewärmtem (37 °C) LB-Medium ohne Ampicillin und eine einstündige Inkubation der Kulturen bei 37 °C im Drehrad. Anschließend wurden 100 µl des Ansatzes auf Agarplatten (Kap. C2.2.1) ausgestrichen und üN bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien gepickt und in 5 ml-LB-Amp-üN-Kulturen vermehrt. Positive Klone wurden entweder durch Plasmidisolierung mit anschließendem Restriktionsverdau (Kap. C2.2.9, C2.2.6) oder durch Kolonie-PCR identifiziert (Kap. C2.2.4).

2.2.9 Plasmidisolierung

Um Plasmide aus Bakterienzellen zu isolieren, wurden zwei Isolations-Kits verwendet, die beide gemäß den Angaben der Hersteller verwendet wurden. Mit dem *Wizard Plus DNA Purification System* (= Mini-Prep, Promega, Mannheim) wurde die Plasmid-DNA aus 3 ml einer 5 ml-LB-Amp-üN-Kultur isoliert (Ausbeute ~ 1 µg DNA). Es wurde benutzt, um aus möglichst vielen Klonen parallel Plasmide zu isolieren, die dann mittels Restriktionsverdau (Kap. C2.2.6) auf das Vorhandensein des gewünschten Inserts überprüft werden konnten (= „screenen“). Der *Nucleobond AX 100 Plasmidisolierungs-Kit* (= Midi-Prep, Macherey und Nagel, Düren) wurde verwendet, um größere Mengen (bis zu 100 µg) möglichst reiner DNA zu isolieren, z.B. für anschließende Sequenzierung (Kap. C2.2.11) oder zur Aufbewahrung positiver Klone. Als Ausgangsmaterial diente dabei eine 100 ml-LB-Amp-üN-Kultur.

2.2.10 DNA-Quantifizierung

Bei relativ großen DNA-Mengen, z.B. aus einer Midi-Prep (Kap. C2.2.9), wurde die DNA-Konzentration photometrisch in Quarzküvetten über das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 260 nm bestimmt. Dabei gilt folgende Formel:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g DNA/ml}] = (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{320}) \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zur Abschätzung kleinerer DNA-Mengen (z.B. PCR-Produkte) wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt und die Fluoreszenz der Probe mit der eines Basenpaarstandards definierter DNA-Konzentration (Abb. 8) verglichen.

2.2.11 DNA-Sequenzierung

Um sicherzugehen, dass durch Restriktionsverdau (Kap. C2.2.6) bzw. Kolonie-PCR (Kap. C2.2.4) als positiv identifizierte Klone keine unerwünschten Mutationen enthielten, wurde eine DNA-Sequenzierung mittels einer modifizierten Kettenabbruchmethoden nach Sanger et al. (1977) durchgeführt.

Als Matrize für die Sequenzierreaktion diente DNA aus einer Midi-Prep (Kap. C2.2.9). Als Primer wurden vektorspezifische Primer verwendet (Tab. 8).

Tab. 8: Primer zu Sequenzierung der *lhca*-Inserts in pDS12/RBSII.

Primer	Sequenz
pDS 12 +	5'ATTTGCTTTGTGAGC 3'
pDS 12 -	5'ACCGAGCGTTCTGAA 3'

Die Ansätze wurden wie in Tab. 9 aufgeführt zusammenpipettiert und einer PCR mit dem ebenfalls in Tab. 9 dargestellten Protokoll unterzogen. Die anschließende Auftrennung der Sequenzierreaktion und die Sequenzanalyse wurden von der Firma GENTERprise (Mainz) vorgenommen.

Tab. 9: Reaktionsansatz zur Sequenzierung der inserierten *lhca*-Gene und Thermocyclerprotokoll für BigDye®-Sequenzierreaktionen (v3.1).

Reaktionsansatz			
Midi-Prep-DNA	170-350 ng		
pDS12-Primer (10 µM)	1 µl		
BigDye-Premix ver3.1™	2 µl		
5 x sequenzing buffer v3.1™	2 µl		
ddH ₂ O	Ad 10 µl		
Protokoll			
Schritte	Zyklenzahl	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1	1	96	60
2	30	96	10
		55	240

Das Editieren der erhaltenen Sequenzen und Chromatogramme erfolgte mit der *Chromas 1.45 Software* (Griffith University, Southport, Australia).

2.3 Proteinüberexpression und „Inclusion Body“-Isolierung

Als Wirtstamm für die Proteinexpression dienten Bakterien des *E. coli*-Stamms JM 101 (Kap. B4), in die durch Transformation (Kap. C2.2.8) Expressionsplasmide mit *lhca*-Genen (Kap. B4) eingeführt wurden.

Aufgrund ihres hydrophoben Charakters führt die Überexpression von Lhc-Proteinen in *E. coli* zur Bildung von Proteinaggregaten. Diese Einschlusskörper (oder „Inclusion Bodies“, IBs) bestehen überwiegend aus denaturiertem, rekombinantem Protein, das sich nach Aufschluß der Bakterienzellen durch Zentrifugation und Waschen mit milden Detergentien relativ leicht isolieren lässt (Rudolph und Lilie, 1996).

Zur Überexpression größerer Proteinmengen wurden standardmäßig 200 ml LB-Amp-Kulturen in Erlenmeyerkolben verwendet, die mit 2 ml einer 5 ml-LB-Amp-üN-Kultur angeimpft wurden. Nach zweistündigem Wachstum (Kap. C2.2.1) bzw. bei einer OD_{550} von 0,45-0,65 erfolgte die Induktion der Überexpression durch Zugabe von 200 μ l 1 M Isopropyl β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG). Nach weiteren 5 h wurden die Bakterien durch 5-minütige Zentrifugation bei 9000 x g pelletiert und die IBs isoliert. Zum Aufbrechen der Bakterienzellen wurde das Pellet in 2 ml Lysispuffer (50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA/NaOH (pH 7,8)) resuspendiert, 0,5 ml einer 1%igen Lysozymlösung (w/v) zugesetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 30 μ l 1 M $MgCl_2$, 30 μ l 0,1 M $MnCl_2$ und 5 μ l DNase I Lösung (5 mg/ml) wurde erneut für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Detergenslösung A (200 mM NaCl, 1% (w/v) Deoxycholat, 1% (w/v) Nonidet P40, 25 mM Tris/HCl (pH 7,5), 2 mM EDTA/NaOH (pH 7,8), 30 mM Dithiothreitol (DTT)) zugegeben, gut gemischt, 2 min auf Eis inkubiert und für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml Detergenslösung B (0,5% (v/v) Triton X-100, 1 mM EDTA/NaOH (pH 7,8), 20 mM DTT) resuspendiert, gevortext und erneut bei 10000 x g zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit Detergenslösung B wurde das nun weiße Pellet in ~600 μ l IB-Suspensionslösung (50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA/NaOH (pH 7,8), 20 mM DTT) aufgenommen. Die Proteinkonzentration wurde wie in Kap. C3.4.1 beschrieben bestimmt und die Reinheit der IB-Präparation per SDS-PAGE (Kap. C3.5.1.1) überprüft.

Wenn es lediglich darum ging zu überprüfen, ob neu konstruierte Klone zur Proteinüberexpression geeignet sind, konnten alternativ 5 ml-LB-Amp-Kulturen in Reagenzgläsern induziert werden. Dazu wurden 500 μ l einer 5 ml-LB-Amp-üN-Kultur in 5 ml frisches LB-Amp überführt und nach etwa 1 h bzw. bei einer OD_{550} von 0,45-0,65 durch Zugabe von 5 μ l 1 M IPTG die Überexpression induziert. Nach weiteren 4-5 h wurden 20 μ l der Bakteriensuspension entnommen, mit 10 μ l Proteindenaturierungspuffer (Kap. C3.5.1.1) versetzt, 1 min gekocht und die Proteinzusammensetzung mittels SDS-Page (Kap. C3.5.1.1) analysiert. Als Negativkontrolle diente die gleiche Menge einer nicht induzierten Kultur.

2.4 Rekonstitution rekombinanter Lhca-Proteine

LHC lassen sich *in vitro* über verschiedene Methoden aus ihren Bestandteilen (Apoprotein, Pigmente, Lipide) rekonstituieren, wobei die Eigenschaften der *in vitro* gebildeten Komplexe denen der nativen Komplexe gleichen (Plumley und Schmidt, 1987; Paulsen et. al., 1993). In dieser Arbeit wurde die für die Rekonstitution von Lhca-Proteinen modifizierte Detergenswechsellmethode nach Schmid et al. (1997) verwendet. Dabei wird das Apoprotein zunächst in Rekonstitutionspuffer mit Lithium-Dodecylsulfat (LDS) und Saccharose solubilisiert, mit OG versetzt und kurz gekocht, wodurch sich um das Protein OG-DS-Mischmizellen bilden. Nach dem Abkühlen wird die Proteinlösung mit Pigmenten gemischt und durch die anschließende Zugabe von eiskaltem KCl das Dodecylsulfat als Kalium-Dodecylsulfat (KDS) ausgefällt. Durch die Veränderung der Proteinumgebung von reinen LDS-Mizellen über OG-DS-Mischmizellen zu reinen OG-Mizellen werden die Proteinfaltung und die Anlagerung der Pigmente induziert. Je nachdem ob der Rekonstitutionsansatz per SDG-UZ (Kap. C2.5) oder mittels schwach denaturierender Gelelektrophorese (Kap. C3.5.1.2) analysiert werden sollte, wurde die Rekonstitution auf zwei leicht unterschiedliche Weisen durchgeführt.

Durchführung:

A) Zur nachfolgenden Aufreinigung über SDG-UZ wurden 167 µg Protein und Pigmentliquots à 200 µg Chl verwendet. Das Protein wurde in 106,7 µl IB-Suspensionslösung (50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA/NaOH (pH 7,8), 20 mM DTT) verdünnt, mit dem gleichen Volumen an doppeltkonzentriertem Rekonstitutionspuffer (200 mM Tris-Base, 10 mM ε-Aminocapronsäure, 2 mM Benzamidin, 4% (w/v) LDS, 100 mM DTT) versetzt und kurz gevortext, um das Protein zu lösen. Nach der Zugabe von 24,7 µl 10%igem OG (w/v) wurde der Ansatz für 1 min gekocht, auf Eis abgekühlt und 8 µl 1 M DTT zugegeben. Nachfolgend wurde die Proteinlösung unter vortexen zu den in 12 µl 100% Ethanol gelösten Pigmenten gegeben. Der Ansatz wurde erneut für 1 min gekocht und zum Abkühlen auf Eis gestellt. Anschließend wurden wiederum unter vortexen 38,4 µl eiskaltes 1 M KCl zugegeben und für 20 min schüttelnd bei 4 °C inkubiert. Durch die nachfolgende 5-minütige Zentrifugation bei 15000 x g und 4 °C wurde das ausgefällte KDS pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und über eine SDG-UZ (Kap. C2.5) aufgereinigt.

B) Wenn es darum ging, die Bildung stabiler Monomere oder Dimere mittels schwachdenaturierender Gelelektrophorese (Kap. C3.5.1.2) zu untersuchen, wurde nur ein Fünftel der Proteinmenge des oben beschriebenen Ansatzes (33 µg) benötigt. Entsprechend wurden auch nur ein Fünftel der Pigmente (40 µg Chl) verwendet, und die Menge aller anderen Lösungen entsprechend reduziert. Im Unterschied zum Rekonstitutionsansatz für Dichtegradienten enthielt der hier verwendete 2 x Rekonstitutionspuffer zusätzlich noch 25% (w/v) Saccharose, die zur Beschwerung der Proben für den nachfolgenden Gelauftrag diente. Außerdem wurde an Stelle der 10%igen (w/v) eine 20%ige (w/v) OG-Lösung verwendet. Der Ablauf der Rekonstitution erfolgte genau wie oben beschrieben. Im Anschluß wurden 20 µl des Überstandes auf ein schwach denaturierendes Gel aufgetragen und aufgetrennt.

2.5 Dichtegradienten-Ultrazentrifugation rekonstituierter Lichtsammelkomplexe

Zur schonenderen Abtrennung von freiem oder nur unspezifisch gebundenem Pigment von rekonstituierten LHC wurde der Rekonstitutionsansatz per SDG-UZ aufgereinigt. Dazu wurden 220 µl eines großen Rekonstitutionsansatzes (Kap. C2.4A) auf SDG (0,09-0,8 M Saccharose, 5 mM Tricine/NaOH (pH 7,8), 0,06% (w/v) β-DM) mit einem Volumen von 11 ml aufgetragen, von denen vor dem Probenauftrag jeweils der oberste Milliliter abgenommen wurde, und 22-24 h bei 37000 Upm im SW41 (bzw. SW40 oder TST41.14)-Rotor (~246000 x g) zentrifugiert. Nach Beendigung der Zentrifugation wurden die r-LHC enthaltenden SDG-Banden abgezogen und direkt charakterisiert oder bei -70 °C eingefroren gelagert.

3. Biochemische und spektroskopische Charakterisierungsmethoden

3.1 Photometrische Chlorophyllbestimmung

Zur photometrischen Bestimmung der Chl-Konzentration von Einzelpigmenten oder Totalextrakt wurde die Absorption von Chl in 80% (v/v) Aceton bei 663,6 und 646,6 nm gemessen. Aus diesen Werten lässt sich nach Porra et al. (1989) wie folgt die Chl-Konzentration berechnen:

$$\text{Chl a} = 12,3 * A_{663,6} - 2,55 * A_{646,6} [\mu\text{g/ml}]$$

$$\text{Chl b} = 20,3 * A_{646,6} - 4,9 * A_{663,6} [\mu\text{g/ml}]$$

Um unspezifische Streuungen zu berücksichtigen, wurde die Absorption bei 750 nm gemessen von den Absorptionswerten bei 663,6 und 646,6 nm subtrahiert.

Zur Bestimmung der Chl-Konzentration von per SDG-UZ aufgereinigten LHC (Kap. C1.3, C2.5) wurden 150 µl der DG-Bande mit 600 µl 100% Aceton versetzt und gut gemischt, so dass sich eine 80%ige Aceton-Lösung (v/v) ergab. Bei hochkonzentrierten Proben (z.B. Thylakoiden und PSI-Präparationen) wurden 5 µl der Probe mit 80%igem Aceton (v/v) versetzt. Ausgefallenes Protein und sonstige Schwebstoffe wurden durch eine kurze Zentrifugation (30 sec, 10000 x g) pelletiert. Die Bestimmung der Chl-Konzentration des Überstandes erfolgte wie oben beschrieben. Natürlich muß dabei der Verdünnungsfaktor der Probe einberechnet werden.

3.2 Tieftemperatur-Fluoreszenzmessungen

Die Messung der Fluoreszenzemission nach Anregung bei einer definierten Wellenlänge ist eine Methode zur Bestimmung der Funktionalität isolierter oder rekonstituierter LHC. Dabei macht man sich zu Nutze, dass im Zuge der Rekonstitution die Pigmente innerhalb eines LHC so angeordnet werden, dass der Energietransfer von Chl *b* nach Chl *a* etabliert wird. Regt man in einer Probe bei einer Wellenlänge von 470 nm selektiv Chl *b* an und erhält ein Fluoreszenzmaximum, das der Emission von Chl *a* entspricht (> 680 nm) bedeutet dies, dass ein Energietransfer von Chl *b* nach Chl *a* stattfindet und deutet darauf hin, dass es sich bei der Probe um einen funktionellen LHC handelt. Enthält eine Probe viel ungekoppeltes Chl *b*, so zeigt sich dies durch einen Emissionspeak bei etwa 652 nm. Durch Aufnahme eines Anregungsspektrums (Excitationspektrum), bei dem die Anregungswellenlänge variiert wird, die Detektionswellenlänge (vorzugsweise die Wellenlänge des Fluoreszenzemissions-

maximums) jedoch gleich bleibt, kann man den Beitrag der Absorption der verschiedenen gebundenen Pigmente zur Fluoreszenzemission untersuchen.

Beide Messungen wurden an den gleichen Proben durchgeführt. Dabei wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit von allen Proben Aliquots entsprechend 2 µg Chl/ml verwendet. Dazu wurde ein Aliquot entsprechend 1,2 µg Chl mit DG-Lösung (0,4 M Saccharose, 5 mM Tricine/NaOH (pH 7,8), 0,06% (w/v) β-DM) auf 200 µl aufgefüllt und mit 400 µl Fluoromaxlösung (75% (v/v) Glycerin, 5 mM Tricine/NaOH (pH 7,8), 0,025% (w/v) β-DM) versetzt und durch Invertieren gemischt, so dass sich eine Chl-Konzentration von 2 µg/ml ergab. Die Messung erfolgte in einer Tieftemperatureinheit (ISA Jobin-Yvon-Spex, Grasbrunn) bei der Temperatur flüssigen Stickstoffs (77 K). Für die Aufnahme von Fluoreszenz-emissionsspektren wurde mit einer Spaltbreite von 2 nm bei 410 nm (Chl *a*) bzw. 470 nm (Chl *b*) angeregt. Die Fluoreszenzemission wurde über den Wellenlängenbereich zwischen 620 und 800 nm in 1 nm Schritten und mit einer Spaltbreite von 1 nm aufgenommen. Excitationsspektren wurden nach Anregung bei der Wellenlänge der maximalen Fluoreszenz-emission (684 nm für Lhca1- und Lhca5-Monomere bzw. Lhca1/Lhca5-Dimere, 735 nm für Lhca1/Lhca4-Dimere und 729 nm für Lhca4-Monomere) über den Wellenlängenbereich zwischen 400 und 500 nm aufgenommen. Die Spaltbreite betrug dabei 4 nm für die Anregung und 2 nm für die Detektion.

3.3 Pigmentanalysen per HPLC

Zur Bestimmung der Pigmentzusammensetzung von rekonstituierten oder nativen LHC wurden aus DG-Banden nach der Methode von Martinson und Plumley (1995) mit 2-Butanol die Pigmente extrahiert, mit 80%igem Aceton (v/v) verdünnt und per HPLC analysiert. Zur Extraktion wurde ein Aliquot der DG-Bande entsprechend 1 µg Chl mit dest. H₂O auf 50 µl aufgefüllt, 33 µl 2-Butanol und 16,5 µl 5 M NaCl zugegeben, gut gemischt und für 30 s bei 10000 x g zentrifugiert. 20 µl der Butanolphase wurde abgenommen und mit dem zweifachen Volumen an 80%igem Aceton (v/v) versetzt. Davon wurden 20 µl auf eine Chromolith Speed-ROD RP-18e Säule aufgespritzt. Die Pigmente wurden durch einen steigenden Acetongradienten von der Säule eluiert, wobei der Anstieg von 70% (v/v) auf 100% Aceton innerhalb von 3 min erfolgte. Dem folgten 1 min Elution mit 100% Aceton, und die Rückkehr zu 70% (v/v) Aceton innerhalb von 30 s. Die eluierten Pigmente wurden durch einen MD-1515 Dioden-Array-Detektor (Jasco, Gross-Umstadt) detektiert. Mit Hilfe von Eichkurven, die aus Einzelpigmenten bekannter Konzentration erstellt wurden (Dr. S. Hobe, Uni Mainz) konnten die im aufgespritzten Probenvolumen enthaltenen Pigmente quantifiziert werden. Dies erfolgte durch Integration der Peakfläche der einzelnen Pigmente mit Hilfe der Borwin PDA Software (Jasco, Groß-Umstadt). Die Umrechnung der µg-Angaben in molare Mengen (über das Molekulargewicht der Pigmente) erfolgte ebenfalls durch diese Software.

3.4 Proteinquantifizierungen

3.4.1 Biorad-Assay für Inclusion Body-Präparationen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von isolierten Einschlusskörpern (IBs) wurde der Bradford-Proteinbestimmungs-Assay der Firma Bio-Rad (München) nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Dabei nutzt man aus, dass sich die maximale Absorptionswellenlänge des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 bei Bindung an Proteine von 460 nm auf 595 nm (Bradford, 1976) verschiebt, und somit die Konzentration der Farbstoff-Protein-Komplexe im Photometer detektiert werden kann. Zunächst wurden 5 µl einer IB-Suspensionslösung mit 5 µl 1%igem LDS (w/v) gelöst und durch Zugabe von 30 µl dest. H₂O verdünnt. Da das in der Probe enthaltene LDS die Proteinquantifizierung verfälschen könnte, wurde eine LDS-Referenz aus 5 µl 1% (w/v) LDS und 35 µl H₂O angesetzt. Von beiden Proben wurden 10 µl entommen und erneut mit 10 µl dest. H₂O gemischt. Zu diesen Proben wurden dann 980 µl der 1:5 mit dest. H₂O verdünnten BioRad-Färbelösung gegeben, die Ansätze nach Durchmischen für 30 min bei RT inkubiert, und im Anschluß die Absorption bei 595 nm gemessen. Als Nullabgleich diente die verdünnte BioRad-Färbelösung ohne Protein. Der für die LDS-Referenz gemessene Wert wurde von dem Wert der Probe abgezogen. Parallel dazu wurde eine BSA-Eichgerade über den Bereich von 2,5 bis 20 µg aufgenommen, eine Regressionsgerade erstellt und aus dieser die Proteinkonzentration der Probe ermittelt.

3.4.2 BCA-Assay für native Lichtsammelkomplexe

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von isolierten LHCI-Fractionen wurde auf den BCA-Assay der Firma Pierce (Rockford, USA) zurückgegriffen, das auf einer Modifikation der Biuret-Proteinbestimmung basiert (Smith et al., 1985). Dabei wird photometrisch die Bildung eines Farbstoff-Protein-Komplexes bei 562 nm detektiert. Diese Methode ist gegenüber Detergenzien unempfindlicher als die Proteinbestimmung nach Bradford. Es wurden Proben gleicher Chl-Konzentration vermessen. Dazu wurde ein Aliquot einer LHCI-DG-Bande (Kap. C1.3) entsprechend 2 µg Chl mit 2 mM Tricine/NaOH (pH 7,8) auf 50 µl aufgefüllt und nach Angaben des Herstellers mit 1 ml „Working Reagent“ versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluß wurde direkt die Absorption gemessen. Als Nullabgleich wurde „Working Reagent“ ohne Protein benutzt. Da in den untersuchten LHCI-Proben Chl enthalten war, das ebenfalls bei 562 nm absorbiert, wurden als Referenz Proben vermessen, die zwar Chl in der gleichen Konzentration wie die LHCI-Probe enthielten, denen allerdings „Working Reagent“ ohne Kupfer zugesetzt wurde, so dass keine Farbreaktion entstehen konnte. Der für diese Referenz gemessene Wert wurde von den für die LHCI-Proben ermittelten Werten abgezogen. Die Proteinkonzentration wurde wiederum mittels der für eine parallel vermessene BSA-Eichreihe ermittelten Regressionsgeraden errechnet.

3.5 Polyacrylamid-Gelelektrophoresen

Die Elektrophorese von Proteinen in Polyacrylamidgelen (PAA-Gelen) ist eine weit verbreitete Methode zur Auftrennung von Proteingemischen und zur Molekulargewichtsbestimmung einzelner Proteine. Das Molekularsieb entsteht dabei durch die radikalische Kopolymerisation von Acrylamidmonomeren mit dem Vernetzer Bisacrylamid zu einem klaren Gel. Ammonium-

peroxodisulfat (APS) dient bei dieser Polymerisation als Radikalbildner und damit als Starter der Polymerisation und Tetramethylethylendiamin (TEMED) fördert die Bildung der Persulfatradikale. Die Porenweite eines Gels wird durch die Gesamtacrylamidkonzentration und das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid bestimmt (Lottspeich, Bioanalytik, 1998).

3.5.1 Eindimensionale Gelelektrophoresen

Eindimensionale Gelelektrophoresesysteme wurden verwendet, um die Zusammensetzung von Proteingemischen, das apparente Molekulargewicht von Proteinen oder die Reinheit von in IB-Präparationen zu untersuchen (Kap. C3.5.1.1), oder um intakte Pigment-Protein-Komplexe aufzutrennen (Kap. C3.5.1.2).

3.5.1.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurde ein diskontinuierliches Elektrophoresesystem in Anlehnung an Laemmli (1970) verwendet. Dieses besteht aus einem Sammel- und Trenngel mit unterschiedlichen pH-Werten und Acrylamidkonzentrationen. Das Sammelgel (pH 6,8) dient der Fokussierung der Probe in einer scharfen Bande, während die eigentliche Auftrennung der Proteine im Trenngel (pH 8,8) stattfindet. Da Proteine im Gegensatz zu Nukleinsäuren unterschiedliche Ladungs- zu Masseverhältnisse besitzen, würden sie im elektrischen Feld nicht der Größe nach aufgetrennt. Deshalb wurden die Proben vor der Elektrophorese mit dem halben Probenvolumen Denaturierungspuffer (5% (w/v) SDS, 180 mM DTT, 70 mM Tris/HCl (pH 8,4), 0,666 M Saccharose, 0,05% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und 1 min gekocht. Durch Anlagerung des im Denaturierungspuffer enthaltenen SDS werden die Proteine denaturiert, in Lösung gebracht und mit einer negativ geladenen „SDS-Hülle“ versehen. Damit erhalten sie ein einheitliches Masse- zu Ladungsverhältnis, und die Wanderung im elektrischen Feld hängt im Wesentlichen von der Proteinmasse und der Porengröße des Gels ab. Durch den Vergleich mit Molekulargewichtstandards (Tab. 10) können die Molekulargewichte einzelner Proteine bestimmt werden (= apparentes Molekulargewicht).

Tab. 10: Protein-Marker zur Molekularmassenbestimmung denaturierter Proteine per SDS-PAGE.

SDS7-Marker (Sigma)		„prestained protein marker“ (Fermentas)	
Markerbestandteile	Molekularmasse [kDa]	Markerbestandteile	Molekularmasse [kDa]
Rinderserumalbumin	66,0	β-Galactosidase	118,0
Ovalbumin	45,0	Rinderserumalbumin	84,0
NADPH	36,0	Ovalbumin	51,0
Carboanhydrase	29,0	Carboanhydrase	35,0
Trypsinogen	24,0	β-Lactoglobulin	27,0
Trypsin-Inhibitor	20,1	Lysozym	21,0
α-Lactalbumin	14,2		

In der vorliegenden Arbeit wurden standardmäßig Mini-Gele (Geldicke 0,75 mm) mit einer Auftrennungsstrecke von 6 cm und einem einheitlichen PAA-Gehalt von 15% im Trenngel und 4,5% im Sammelgel verwendet. Diese Gele wurden mit dem „Hoefer® Multiple Gel Caster“

System (Hoefler Pharmacia, San Francisco, CA, USA) hergestellt. Dazu wurde zunächst die Trenngellösung zusammenpipettiert und in die Gießapparatur eingefüllt. Um das Austrocknen der Geloberfläche zu verhindern wurde die Lösung mit 1-Butanol überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das Butanol durch sequentielles Waschen mit Ethanol und Wasser entfernt, die Sammelgellösung aufgegossen und zur Bildung der Auftragstaschen Kämme eingesetzt.

Zur besseren Auftrennung der Proteinbanden im Molekulargewichtsbereich der LHCl-Proteine zwischen 20000 und 25000 wurden einige Parameter der PAA-Gele variiert. Zum einen wurde der PAA-Gehalt des Trenngels verändert (zwischen 10 und 20%). Desweiteren wurden Maxigele mit einer längeren Auftrennungsstrecke hergestellt (16 cm, 1 mm Geldicke; Biometra, Göttingen) und Gele mit einem linearen PAA-Gradienten von 14-20% im Trenngel benutzt. Zur Herstellung des PAA-Gradienten wurden zwei Lösungen mit unterschiedlichen PAA-Konzentrationen (14% und 20%) während des Gießens des Trenngels in einem Gradientenmischer (Biorad, München) gemischt. In Tab. 11 ist die Zusammensetzung der verwendeten Gele zusammengestellt.

Tab. 11: Zusammensetzung der für die denaturierenden Gelelektrophoresen verwendeten Polyacrylamidgele.

Komponente	Trenngel			Sammelgel
	„normal“	Gradientengel		
		Lsg A	Lsg B	
Acrylamid/Bisacrylamid (30/1)	zwischen 10% und 20% (w/v)	14% (w/v)	20% (w/v)	5% (w/v)
Tris/HCl (pH 8,8)	375 mM	375 mM	375 mM	-----
Tris/HCl (pH 6,8)	-----	-----	-----	125 mM
TEMED	0,04% (v/v)	0,05% (v/v)	0,1% (v/v)	0,05% (v/v)
APS	0,025% (w/v)	0,01% (w/v)	0,01% (w/v)	0,05% (w/v)

Auf Minigele wurden die folgenden Probenmengen aufgetragen:

IB-Präparation: 1,5 µg Protein

LHCl: 2 µg Chl

PSI: 5 µg Chl

Thylakoide: 7 µg Chl

Zur Auftrennung in Maxigelen wurde das 1,5-fache dieser Mengen verwendet.

Alle denaturierenden PAA-Gelelektrophoresen wurden bei 8-10 °C mit 2 x SDS-Laufpuffer (50 mM Tris-Base, 384 mM Glycin, 1 mM EDTA/NaOH (pH 7,5), 0,1% (w/v) SDS (nur für Kathodenpuffer nötig)) durchgeführt. Der Gellauf erfolgte für Minigele für etwa 2 h bei 20 mA pro Gel. Maxigele liefen für mindestens 18 h bei konstant 15 mA pro Gel.

Im Anschluss an die Elektrophorese konnten die aufgetrennten Proteine über verschiedene Methoden nachgewiesen werden (Kap. C3.6).

3.5.1.2 Schwach denaturierende LDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Eine schwach denaturierende Gelelektrophorese wurde durchgeführt, um intakte Pigment-Protein-Komplexe aufzutrennen und hinsichtlich ihres Oligomerisierungsgrades zu untersuchen. Die Durchführung erfolgte wie in Schmid und Schäfer (1994) beschrieben.

Jeweils 20 µl der Proben (Rekonstitutionsansatz (Kap. C2.4) oder aufkonzentrierter SDG-Banden mit nativen oder r-LHC (Kap. C1.3, C2.5) wurden ohne vorherige Denaturierung auf ein PAA-Minigel aufgetragen, welches zur zusätzlichen Stabilisierung der Komplexe Saccharose enthält (Zusammensetzung siehe Tab. 12). SDG-Banden wurde vor dem Gelauftrag zur Beschwerung 80%iges Glycerin (v/v) (ca. 1/5 des Probenvolumens) zugesetzt. Als Laufpuffer wurde 1 x LDS-Puffer (25 m Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) LDS (nur für Kathodenpuffer nötig)) verwendet. Dies ermöglichte es, die Elektrophorese bei 4 °C durchzuführen, da LDS im Gegensatz zu SDS bei dieser Temperatur nicht ausfällt. Außerdem wurde die Elektrophorese bei einer niedrigen Stromstärke von 4 mA pro Gel durchgeführt. Insgesamt führte dies dazu, dass intakte Pigment-Protein-Komplexe aufgetrennt werden konnten. Direkt nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele eingescannt. Eine Anfärbung war aufgrund der Grünfärbung der Pigment-Protein-Komplexe nicht nötig.

Tab. 12: Zusammensetzung der für die schwach denaturierende LDS-PAGE verwendeten PAA-Gele

Komponente	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid/Bisacrylamid (30/1)	12% (w/v)	4% (w/v)
Tris/HCl (pH 9,1)	425 mM	-----
Tris/H ₂ SO ₄ (pH 6,1)	-----	54 mM
Saccharose	292 mM	292 mM
TEMED	0,075% (v/v)	0,075% (v/v)
APS	0,03% (w/v)	0,06% (w/v)

3.5.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Eine der wenigen Methoden, die es ermöglicht einzelne Proteine in einem komplexen Proteingemisch aufzutrennen, ist die zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese. Dabei werden die Proteine im ersten Schritt nach ihren isoelektrischen Punkten (pI) und im zweiten Schritt nach ihren Molekulargewichten aufgetrennt. Die Nettoladung eines Proteins ist die Summe der Ladungen seiner Aminosäure-Seitenketten. Daher sind Proteine amphiphile Moleküle, die je nach pH ihrer Umgebung positiv, negativ oder ungeladen sind. Wenn der Umgebungs-pH gleich dem pI eines Proteins ist, so ist dessen Nettoladung Null. Bei einem pH unterhalb des pI sind Proteine positiv, oberhalb davon negativ geladen. In einem pH-Gradienten wandern positiv geladene Proteine im elektrischen Feld zur Kathode, negativ geladene zur Anode. Bei Annäherung an einen pH in der Nähe ihres pI, schwächt sich die Stärke der Ladung ab. Die Wanderung wird gestoppt, sobald das Protein ungeladen ist, also bei dem pH, der dem pI entspricht. Sobald das Protein aus diesem pH-Bereich diffundiert, wird es wieder geladen und wandert aufgrund des elektrischen Feldes zu dem Bereich zurück, in dem der pH gleich dem pI ist. Diese Fokussierung macht es möglich, in der ersten Dimension einer 2D-Gelelektrophorese

Proteine mit geringen Ladungsunterschieden aufzutrennen. Im Anschluß daran erfolgt die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht mittels SDS-PAGE (Lottspeich, 1998).

3.5.2.1 Probenvorbereitung

Für die 2D-Gelelektrophorese wurden Aliquots von PSI-Präparationen (Kap. C1.2) entsprechend 20 µg - 100 µg Chl verwendet. Um Chl und Lipide, die sich störend auf die isoelektrische Fokussierung auswirken könnten, zu entfernen, wurden die Proteine nach Wessel und Flügge (1994) mit Methanol-Chloroform gefällt. Dazu wurde das entsprechende Aliquot mit dest. H₂O auf 100 µl aufgefüllt, mit 400 µl Methanol versetzt und gevortext. Nach Zugabe von 100 µl wassergesättigtem Chloroform und erneutem Vortexen, wurden 200 µl dest. H₂O zugegeben und 1 min zentrifugiert (10000 x g). Dadurch entstand eine Phasentrennung. Das Protein befand sich in dem milchigen Bereich zwischen den beiden Phasen. Die obere Phase wurde verworfen. Zu der restlichen Lösung wurden 300 µl Methanol pipettiert und gevortext. Dadurch fiel das Protein aus und konnte pelletiert werden (2 min, 10000 x g). Anschließend wurde das Pellet zweimal mit 95% (v/v) Methanol gewaschen (2 min, 10000 x g) und für 15 min in der Speed Vac getrocknet. Dann konnte es bei -20 °C gelagert werden oder folgendermaßen solubilisiert werden.

Vor dem Auftrag auf die IEF wurde das Proteinpellet mit 380 µl Probenpuffer (8 M Harnstoff, 2 M Thiohanstoff, 30 mM DTT, 4% (w/v) Chaps, 0,05% (w/v) β-DM, 0,5% (v/v) IPG-Puffer pH 3-10 bzw. pH 4-7 (Amersham, Freiburg), 20 mM Tris-Base, 0,5% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und durch einstündige Inkubation bei RT auf dem Schüttler in Lösung gebracht. Danach wurden eventuell noch vorhandene Proteinaggregate durch eine 15-minütige Zentrifugation (10000 x g) pelletiert und 350 µl des proteinhaltigen Überstands in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach erneuter Zugabe von 0,5% (v/v) IPG-Puffer wurde die Probe für die erste Dimension verwendet.

3.5.2.2 Erste Dimension (Isoelektrische Fokussierung)

Bei der ursprünglichen Methode der isoelektrischen Fokussierung (IEF; O'Farrell, 1975) bildet sich in einem PAA-Rundgel ein durch Carrierampholyte vermittelter pH-Gradient während der Elektrophorese aus. In dieser Arbeit wurde jedoch das modifizierte Verfahren nach Bjellqvist (1982) verwendet. Hierbei wird durch kovalente Verknüpfung von basischen und sauren Puffergruppen an die PAA-Matrix während der Polymerisation ein immobilierter pH-Gradient erzeugt.

Die IEF wurde in einer IPGphor-Apparatur (Amersham, Freiburg) durchgeführt. Es wurden vorgefertigte IPG-Strips (Amersham, Freiburg) mit linearen pH-Gradienten zwischen 3 und 10 oder 4 und 7 verwendet. Diese wurden vor der eigentlichen Elektrophorese für 12 h bei 20 °C in Gegenwart der Probe rehydratisiert. Dazu wurden 350 µl der Proteinlösung (Kap. C3.5.2.1) vorsichtig in der Striphalterung verteilt und der Gelstreifen luftblasenfrei darauf gelegt. Um eine Austrocknung des Gels während der Elektrophorese zu verhindern, wurde mit Mineralöl überschichtet. Die eigentliche Elektrophorese erfolgte direkt im Anschluß an die Rehydratisierung bei 15 °C und 50 µA pro Strip nach dem in Tab. 13 aufgeführten Programm. Sie wurde beendet sobald 60 KVh erreicht wurden, was meist nach einer Gesamtdauer (inklusive Rehydratisierung) von 22-23 h der Fall war.

Tab. 13: Elektrophoreseprogramm für die IEF.

Spannung	Dauer
300 V	15 min
500 V	30 min
1000 V	60 min
3000 V	60 min
8000 V	~ 7 h

Nach der IEF wurden die Gelstreifen zur Sättigung der Proteine mit SDS und Reduzierung von Disulfidbrücken für 15 min in Äquilibriumspuffer 1 (50 mM Tris, 6 M Harnstoff, 30% (v/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS, 2% (w/v) DTT) geschwenkt. Anschließend wurden sie 5 min in Äquilibriumspuffer 2 (50 mM Tris, 6 M Harnstoff, 30% (v/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS, 2,5% (w/v) Iodacetamid, 0,5% (w/v) Bromphenolblau) inkubiert, um eine Carbamidomethylierung der Cysteinreste zu erreichen, wodurch die erneute Entstehung von Disulfidbrücken verhindert wird. Dann wurde kurz mit dest. H₂O gespült und der IEF-Strip auf das Gel für die 2. Dimension gelegt.

3.5.2.3 Zweite Dimension (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Für die zweite Dimension wurden die Gelstreifen auf ein PAA-Trenngel (13% Acrylamid/Bisacrylamid (30:1), 375 mM Tris/HCl (pH 8,8), 0,025% (w/v) Na₂S₂O₃) mit einem Format von 20 x 20 cm (BioRad, München) aufgelegt, dem kein Sammelgel vorgeschaltet war. Zur Fixierung wurde die Gelstreifen der IEF mit 0,5% (w/v) Agarose überschichtet.

Die Elektrophorese erfolgte bei 8 °C für 4-5 h mit 1 x SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 0,1% (w/v) SDS, 192 mM Glycin) bei 30 mA pro Gel oder üN für mindestens 18 h mit 5 mA pro Gel. Im Anschluss an die Elektrophorese konnten die aufgetrennten Proteine über verschiedene Methoden nachgewiesen werden (Kap. C3.6).

3.6 Proteinnachweismethoden

Zum Nachweis von per PAA-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinen wurden verschiedene Methoden verwendet. Wenn alle aufgetrennten Proteine sichtbar gemacht werden sollten, wurden PAA-Gele entweder mit Coomassie oder Silber gefärbt. Der Nachweis von phosphorylierten Proteinen erfolgte ebenfalls direkt im Gel mit einem Phosphoprotein-detektions-Kit (Kap. C3.6.1). Um spezielle Proteine spezifisch nachzuweisen wurden Westernblots durchgeführt (Kap. C3.6.2) oder massenspektrometrische Messungen vorgenommen (Kap. C3.6.3).

3.6.1 Proteinfärbungen im Gel

3.6.1.1 Coomassie-Färbung

Proteine können im SDS-PAA-Gel mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue reversibel angefärbt werden. Die Nachweisgrenze liegt hier bei ~100-200 ng (Lottspeich, 1998). Die Gele wurden dafür zunächst für 30 min in Färbelösung (0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue (Serva), 40% (v/v) Ethanol, 7% (v/v) Essigsäure) geschwenkt. Dann wurden die Gele ca. 20 min in 1. Entfärber (20% (v/v) Ethanol, 7% (v/v) Essigsäure) inkubiert bis Proteinbanden sichtbar wurden. Anschließend wurde mit 10% (v/v) Essigsäure der Gelhintergrund vollständig entfärbt (meistens üN). Zur Dokumentation wurden die Gele eingescannt und zwischen zwei Cellophanfolien getrocknet.

3.6.1.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine im Vergleich zur Coomassiefärbung wesentlich sensitivere Methode, um Proteine im Gel sichtbar zu machen (Nachweisgrenze 5-30 ng). Sie wurde bei der 2D-Gelelektrophorese bevorzugt angewendet, da die Proteinmenge in vielen Spots zu gering war, um sie durch eine Coomassie-Färbung sichtbar zu machen. Das Prinzip der Silberfärbung beruht darauf, dass einige Silberionen von Proteinen gebunden und durch deren funktionelle Gruppen und Peptidbindungen zu Silberkeimen reduziert werden. Im Anschluß werden durch alkalisches Formaldehyd alle sich im Gel befindenden Silberionen zu Silber reduziert. Da dies verstärkt an den Silberkeimen der Proteine geschieht, färben sich Proteinbanden schneller dunkel als der Rest der Gelmatrix. Das Abstoppen der Reaktion erfolgt durch Zugabe von EDTA (Rehm, 2002).

Die PAA-Gele wurden zunächst 30 min in Fixierlösung (10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Ethanol) inkubiert und anschließend für 30 min in „Sensitizing“-Lösung (30% (v/v) Ethanol, 0,2% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 6,8% (w/v) Na-Acetat) überführt. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min in dest. H_2O wurde 20 min mit 0,25% (w/v) Silbernitrat inkubiert. Überschüssiges Silber wurde durch Abspülen mit dest. H_2O entfernt und das Gel in „Developing“-Lösung (2,5% (w/v) Na_2CO_3 , 0,04% (v/v) Formaldehyd) so lange entwickelt bis Spots sichtbar wurden. Zum Abstoppen wurde das Gel in 40 mM EDTA überführt.

3.6.1.3 Phosphoproteinnachweis

Zum Nachweis von Phosphoproteinen in SDS-PAA-Gelen wurde das „Pro-Q Diamond Phosphoprotein stain“-Kit der Firma Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA) verwendet. Es ermöglicht eine Identifizierung von Phosphatgruppen, die an Tyrosin-, Serin- oder Threoninresten gekoppelt sind. Die Intensität des Signals steigt mit zunehmender Anzahl der Phosphatgruppen linear an. Somit ist es möglich, den Grad der Phosphorylierung zu bestimmen. Zunächst wurden die Proteine im PAA-Gel üN durch Inkubation in Fixierlösung (50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure) fixiert. Anschließend wurde das Gel zweimal 10 min mit dest. H_2O gewaschen und für 2 h in der gelieferten Gelfärbelösung im Dunkeln geschwenkt. Danach wurde das Gel entfärbt, indem es unter Lichtabschluss dreimal für 10 min in Entfärbelösung (20% (v/v) 1,2 Propandiol, 50 mM Na-Acetat (pH 4,0)) inkubiert wurde. Im Anschluß wurden die markierten Phosphoproteine durch UV-Licht (300 nm) in einem Transilluminator (VersaDoc, BioRad, München) angeregt und die Fluoreszenzemission bei 580 nm detektiert.

3.6.2 Westernblot

Bei einem Westernblot wird ein Proteingemisch zunächst über eine SDS-PAGE (Kap. C3.5.1.1) aufgetrennt und die Proteinbanden über Elektrotransfer aus dem Gel auf eine Membran übertragen, wobei die Lagebeziehung der Proteine zueinander erhalten bleibt. Auf der Membran sind die immobilisierten Proteine leichter zugänglich als im Gel und lassen sich daher besser spezifisch nachweisen (z.B. über eine Antikörperreaktion, AK-Reaktion). Um später die detektierten Banden einem bestimmten Protein zuordnen zu können, wurde entweder ein zweites, parallel bearbeitetes Gel mit Coomassie gefärbt (Kap. C3.6.1.1) oder die Proteinbanden auf der Membran mit PonceauS angefärbt (Kap. C3.6.2.2).

3.6.2.1 Elektrotransfer

Der Elektrotransfer wurde mit einem Semidry-Blotter (Peqlab, Erlangen) durchgeführt. Dazu wurden das PAA-Gel, die Nitrocellulosemembran (0.45 µm Porendurchmesser, Peqlab, Erlangen) und Filterpapier (GB002, Schleicher und Schuell, Dassel) zunächst etwa 10 min in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol) äquilibriert und anschließend die Blotapparatur wie folgt zusammengebaut:

- Kathode
- vier Lagen Filterpapier
- PAA-Gel
- Nitrocellulose
- vier Lagen Filterpapier
- Anode

Dabei ist darauf zu achten, dass zwischen den einzelnen Lagen keine Luftblasen entstehen. Der Elektrotransfer erfolgte bei 0,8 mA/cm² Gelfläche für 1½ bis 2 Stunden.

3.6.2.2 Ponceau S-Färbung

Zur Färbung wurde die Membran kurz (1-2 min) in Ponceau S-Lösung (0,2% (w/v) Ponceau S, 3% (w/v) Trichloressigsäure) eingetaucht, wodurch sie rot angefärbt wurde. Nachfolgend wurde so lange mit dest. H₂O entfärbt, bis Proteinbanden sichtbar wurden. Diese wurden mit einem Bleistift markiert. Vor der anschließenden Inkubation mit dem primären AK mußte die Membran durch Spülen mit dest. H₂O vollständig entfärbt werden.

3.6.2.3 Proteindetektion mit Antikörpern

Die auf der Nitrocellulosemembran immobilisierten Proteine wurden mit Hilfe von spezifischen AK nachgewiesen. Dafür wurde die Membran zunächst durch mindestens 1 h Inkubation in Blockierungslösung (137 mM NaCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 7,9 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 2% (w/v) Magermilchpulver (Neuform, DE-Vau-GE Gesundheitswerk GmbH, Lüneburg) mit Protein abgesättigt, um zu verhindern, dass der AK unspezifisch an die Membran bindet. Nachfolgend wurde mit dem primären AK inkubiert. Die Konzentration der AK-Lösung (Verdünnung in Blockierungslösung), die Länge der Inkubation und die Inkubationstemperatur hingen von dem verwendeten Antiserum und der Art der Proteinauftrennung ab. Es wurden AK der Firmen Agrisera (Vännas, Schweden) und Eurogentec (Liege, Belgien) sowie aus den Laboren von L. A. Staehelin (University of Colorado, Boulder, CO, USA) und S. Jansson (University of Umeå,

Schweden) verwendet. Alle verwendeten primären AK und deren Inkubationsbedingungen sind in Tab. 14 zusammengefasst.

Tab. 14: Überblick über die Peptidsequenzen für die Herstellung der primären Antikörper, die Herkunft der Antikörper und die jeweiligen Inkubationsbedingungen. 1DE, eindimensionale Gelelektrophorese; 2DE, zweidimensionale Gelelektrophorese, *L. esc.*, *Lycopersicon esculentum*, *A. th.*, *Arabidopsis thaliana*.

Protein	Zielsequenz	Pflanze	Hersteller	Konzentration	Inkubationszeit ¹⁾	
					1DE	2DE
Lhca1	SADWMPQRPR	<i>A. th.</i>	Agrisera	1:2000	2 h	üN
Lhca2	AADPDRPIWFPGS	<i>A. th.</i>	Agrisera	1:1000	2 h	üN
	PLWFPGSTPPE	<i>Petunie</i>	Staehelin et al. (1992)	1:300	üN	üN
Lhca3	RQLWFASKQSL	<i>A. th.</i>	Agrisera	1:500	2 h	üN
	1. PPVKQGADRQLWFAS 2. MGKQYFLGLEKGLAGS	<i>L. esc.</i>	Eurogentec (Serum)	1:750	2 h	--
Lhca4	KGEWLPLGLASP	<i>A. th.</i>	Agrisera	1:1000	2 h	üN
	1. KKGWLPGLASPD 2. IFKNYSLPPNKCG	<i>L. esc.</i>	Eurogentec (Serum)	1:750	2 h	--
Lhca5	FAETKRYMDFVSPGS	<i>A. th.</i>	Ganeteg et al. (2004)	1:750	2 h	--
	1. QAKPGSFFGLEAALEC 2. ILFTDLLRVTGIRNLP	<i>L. esc.</i>	Eurogentec (Serum)	1:200	üN	--

1) Die Inkubation erfolgte in der Regel bei RT, nur üN wurde bei 8° C inkubiert.

Nach der Inkubation mit primärem AK wurde dreimal etwa 10 min mit Blockierungslösung gewaschen, um unspezifisch gebundenen AK zu entfernen. Der an das Protein gebundene primäre AK wurde dann mit Hilfe von sekundären AK detektiert, die in Tab. 15 aufgeführt.

Tab. 15: Verwendete sekundäre Antikörper mit daran gekoppeltem Detektionssystem und Inkubationsbedingungen. 1) Die Inkubation erfolgte bei RT.

Sekundärantikörper				
	Hersteller	Nachweissystem	Konzentration	Inkubationszeit ¹⁾
Anti-Kaninchen IgG, gekoppelt mit alk. Phosphatase	Chemicon	NBT/BCIP	1:2500	1-2 h
Anti-Kaninchen IgG gekoppelt mit alk. Phosphatase	Dianova	NBT/BCIP	1:10000	1-2 h
Anti-Kaninchen IgG gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase	Sigma	„enhanced chemoluminescence“	1:10000	1-2 h

Nach der Inkubation mit sekundärem AK wurde erneut dreimal 10 min mit Blockierungslösung gewaschen. Die Detektion des sekundären AK erfolgte über die Umsetzung eines Substrats durch ein an den sekundären AK gekoppeltes Enzym.

Wenn es sich dabei um eine Alkalische Phosphatase (AP) handelte, wurde zur Detektion das NBT/BCIP-System verwendet. Dabei spaltet die AP die Phosphatgruppen von 5-Bromo-4-chloro-3-indolyphosphat (BCIP) ab, das dabei oxidiert wird und einen violetten Niederschlag bildet. Außerdem reduziert die AP Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT), wodurch sich ebenfalls eine violette Färbung ergibt (Blake et al., 1984). Die Membran wurde dazu so lange in der AP-Färbelösung (Tab. 16) inkubiert bis dunkle Banden sichtbar wurden. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Membran mit dest. H₂O gewaschen.

Im Fall der Peroxidase erfolgte die Detektion über das „enhanced chemoluminescence“ (ECL) System der Firma Amersham (Freiburg). Dazu wurde die Membran für 1 min mit einer 1:1 Mischung der untenstehenden Lösungen (Lösung A+B, Tab. 16) geschwenkt, kurz abgetupft, ein Röntgenfilm (Amersham, Freiburg) aufgelegt und für mindestens 20 min inkubiert. Die Entwicklung des Films erfolgte in einem Vollautomaten (AGFA, Suhl).

Tab. 16: Färbelösungen zur Antikörperdetektion über das NBT/BCIP- bzw. das ECL-System.

AP-Färbelösung	10 ml AP-Puffer (100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 100 mM Tris/HCl pH 9,5) + 66 µl 5% (w/v) NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid in 70% (v/v) DMF) + 33 µl 5% (w/v) BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyphosphat in 100% DMF)
Lösung A	3 ml 100 mM Tris/HCl (pH 8,5) +13,3 µl 90 mM P-conmaric-acid (= 14 mg/ml in DMSO) +1.66 µl H ₂ O ₂
Lösung B	3 ml 100 mM Tris/HCl (pH 8,5) 20 µl 250 mM Luminol (= 3-aminophalhydrazin, 44 mg/ml in DMSO)

3.6.3 Massenspektrometrische Verfahren

Die Massenspektrometrie ist eine Analysetechnik zur Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, in der aus einer Substanzprobe ein Strahl gasförmiger Ionen erzeugt wird, einem Massenanalysator, der die Ionen hinsichtlich ihres Masse/Ladungsquotienten (m/z) auftrennt und einem Detektor, der ein Massenspektrum liefert, aus dem abgelesen werden kann, welche Ionen gebildet wurden (Lottspeich, Bioanalytik, 1998).

Bei dem für diese Arbeit überwiegend verwendeten Gerät handelte es sich um einen Ionenspray-Tandem-Massenspektrometer (ESI-MS/MS). Die Ionisierung erfolgt hierbei durch Elektrospray-Ionisierung (ESI), die Massenanalyse mittels einer Quadrupol-Ionenfalle. Dem Massenspektrometer war eine „reversed-phase“-HPLC-Säule zur Auftrennung des zu analysierenden Peptidgemisches vorgeschaltet (LC-ESI-MS/MS). Im Unterschied zu einem „einfachen“ Massenspektrometer (ESI-MS), mit dessen Hilfe sich das Molekulargewicht eines Proteins oder Peptids bestimmen lässt, kann in einem Tandem-Massenspektrometer (ESI-MS/MS) die Aminosäuresequenz von Peptiden ermittelt werden.

Zunächst wird dazu über das m/z -Verhältnis das Molekulargewicht der Peptide bestimmt (MS-Spektrum). Nachfolgend kann ein bestimmtes Peptid in der Ionenfalle „festgehalten“ und durch Kollision mit Gasatomen (Helium) eine weitere Fragmentierung dieses Ions herbeigeführt

werden (CID = collisionally induced decay). Die Molekulargewichte der einzelnen Fragmentationen werden wiederum detektiert und daraus ein sogenanntes CID-Spektrum erstellt. Bei der Auswertung dieser Spektren wird ausgenutzt, dass Peptide bevorzugt an den Peptidbindungen auseinanderbrechen, so dass eine Abfolge von Fragmenten entsteht, die um jeweils eine Aminosäure verkürzt sind. Da dies vom N-terminalen oder vom C-terminalen Ende her geschehen kann, erhält man zwei unterschiedliche Fragmentierungsmuster, die sogenannten y- und b-Serien. Durch den Vergleich der gemessenen CID-Spektren (MS/MS-Spektren) mit solchen, die durch den theoretischen Verdau von in Datenbanken enthaltenen Proteinsequenzen generiert werden, wird eine Zuordnung der in der Probe enthaltenen Peptide zu schon bekannten Proteinen erreicht. Dieser Abgleich wird mit Hilfe einer Software durchgeführt.

Werden Peptide detektiert, die nicht mit bekannten Proteinen übereinstimmen, so werden diese Aminosäuresequenz benutzt, um eine BLAST-Suche in den NCBI-cDNA- bzw. EST-Datenbanken durchzuführen, in der Hoffnung so auf unbekannte Proteine zu stossen, denen die gefundenen Sequenzen eindeutig zugeordnet werden können. In Abb. 9 ist die Vorgehensweise zur Proteinidentifikation per MS/MS schematisch zusammengefasst.

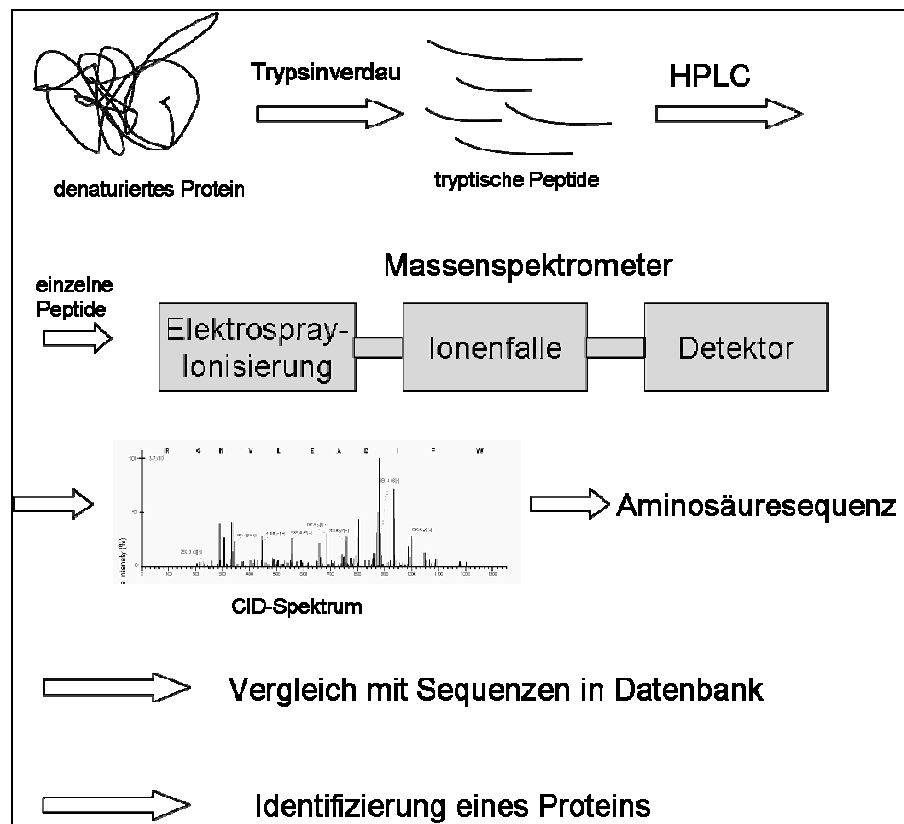


Abb. 9: Überblick über die Vorgehensweise zur Identifikation von Proteinen mittels ESI-MS/MS.

3.6.3.1 *Elektrospray-Ionisierungs-Tandem-Massenspektrometrie*

Die im Folgenden beschriebenen MS/MS-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Einar J. Stauber am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Universität Jena im Labor von PD M. Hippler durchgeführt.

Für die ESI-MS/MS-Messungen wurde eine PSI-Präparation zunächst mittels 1D- oder 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt (Kap.C3.5), die Proteine mit Coomassie oder Silber angefärbt (Kap. C3.6.1), und die gewünschten Banden bzw. Spots aus dem Gel ausgeschnitten. Die in der Gelmatrix enthaltenen Proteine wurden, nachdem die Schnipsel entfärbt und das SDS herausgewaschen war, tryptisch verdaut und die entstandenen Peptide aus dem Gel eluiert. Nachfolgend wurden die Peptidgemische chromatographisch aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert.

Praktische Durchführung:

Der Verdau der Proteine im Gel und die anschließende Elution der Peptide erfolgte nach der Methode von Mortz et al. (1994). Die Proteinspots bzw. -banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein sauberes Eppendorfgefäß überführt. Falls es sich um silbergefärbte Proben handelte, wurden diese durch achtminütige Inkubation in einer 1:1 (v/v) Mischung aus 30 mM $K_3Fe(CN)_6$ und 100 mM $Na_2S_2O_3$ entfärbt. Das nachfolgende Vorgehen war für silber- und coomassiegefärbte Proben identisch. Die Gelschnipsel wurden zunächst dreimal mit 0,5 ml dest. H_2O gewaschen. Dann wurden 500 μ l eines Acetonitril/ H_2O -Gemisches (3:2) zugegeben und für 20 min inkubiert, wodurch die Gelschnipsel schrumpften. Nach Entfernen der Flüssigkeit wurden die Schnipsel in einer Speed Vac für 15 min getrocknet. Anschließend folgte die Rehydratisierung in 50 μ l 50 mM NH_4HCO_3 . Dieser Schrumpfungs-/Rehydratisierungszyklus wurde dreimal wiederholt, um SDS und gegebenenfalls Coomassie zu entfernen. Der Hydratisierungsschritt des letzten Zyklus wurde mit 10 μ l 50 mM NH_4HCO_3 , dem pro μ l 60 ng Trypsin („sequence grade methylated trypsin“, Promega) zugesetzt waren, durchgeführt (bzw. 125 ng Trypsin/ μ l im Falle von potentiellen Lhca2-Spots). Dadurch wurde erreicht, dass das Trypsin in den Gelschnipsel eindrang. Nach 20 min wurde die überschüssige Trypsinlösung abgenommen und nochmals 50 μ l 50 mM NH_4HCO_3 zugegeben. Im Anschluß wurde der Ansatz \bar{u} N bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Dann wurden 100 μ l Acetonitril/ H_2O -Gemisch (3:2) zugegeben und für 2-3 h unter vortexen inkubiert, um die Peptide aus dem Gel zu eluieren. Dieser Überstand wurde ebenfalls abgenommen, mit dem vorherigen Überstand vereinigt und in der Speed-Vac eingetrocknet (2-3 h). Die Lagerung der Proben erfolgte in getrocknetem Zustand bei -70 °C. Vor dem Auftrag auf die HPLC-Säule wurden die Proben in 10 μ l Puffer A (0,1% (v/v) Ameisensäure, 5% (v/v) Acetonitril, 95% (v/v) H_2O) aufgenommen und für 5 min bei 16000 x g zentrifugiert, um Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurden 9 μ l in ein „autosampling vial“ überführt.

Die Injektion der Probe, die chromatographische Auftrennung der Peptide und die Aufnahme und Prozessierung der MS/MS-Daten wurden in einem vollautomatisierten Aufbau durchgeführt. Die Probeninjektion (jeweils 1 μ l) erfolgte durch einen *Famos-48-well plate autosampler* (LC-Packings, Amsterdam, Niederlande). Die Peptidmischung wurde über eine LC-Packing

PepMap C18-Säule (3 µm Partikelgröße, 100 Å Porendurchmesser; LC-Packings, Amsterdam, Niederlande) aufgetrennt. Die Elution erfolgte durch Mischungen aus Puffer A (0,1% (v/v) Ameisensäure, 5% (v/v) Acetonitril, 95% (v/v) H₂O) und Puffer B (0,1% (v/v) Ameisensäure, 80% (v/v) Acetonitril, 20% (v/v) H₂O) mit den in Tab. 17 zusammengestellten Mischungsverhältnissen innerhalb des aufgeführten Zeitprofils. Die Verbindung zwischen der flüssigen Phase (Chromatographie) und der Gasphase (Massenspektrometer) stellte eine Silikatnadel (silica needle, 75 µm Innendurchmesser, 12 cm Länge, 30 µm Öffnung; New Objective, Woburn, CA, USA) dar. Die Elektrospray-Ionisierung erfolgte durch Anlegung einer Spannung von +1,3 kV an diese Nadel. Bei dem Massenspektrometer handelte es sich um ein Ionenfallen-Massenspektrometer (LCQ Deca XP Iontrap Mass-spectrometer; Thermofinnigan, San Jose, CA, USA). Die Spektren wurden im sogenannten „triple-play“ Modus aufgenommen. Dabei wurden zunächst alle Ionen mit einem m/z Verhältnis zwischen 400 und 1200 detektiert. Im Anschluß wurden alle Ionen die sich im Größenbereich (+/- 10 Einheiten) des ausgewählten Ions befanden detektiert und ein MS/MS-Scan durchgeführt. Die Auswahl der Ionen erfolgte automatisch durch die Instrumenten-Software, wobei die Auswahl nach absteigender Häufigkeit vorgenommen wurde (für genauere Angaben siehe Stauber et al., 2003)

Tab. 17: Elutionsprofil der Chromatographie, die der Massenspektrometrie vorgeschaltet war.

Zeit	Puffer A	Puffer B
0-8	95%	5%
8-38	95 → 50%	5 → 50%
38-39	50 → 5%	50 → 95%
39-49	5%	95%
49-50	5 → 95%	95 → 5%
50-75	95%	5%

Auswertung der MS/MS-Daten:

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Finnigan Sequest/Turbo Sequest Software (revision 2.0, ThermoQuest, San Jose, CA, USA). Dabei wurden die gemessenen MS/MS-Spektren mit theoretischen MS/MS-Spektren von tryptischen Peptiden, die aus den untenstehenden Datenbanken generierten wurden, verglichen und dadurch Proteinen zugeordnet. Als Kriterien für die Signifikanz dieser Zordnung diente der „cross-correlation Faktor“ (X_{corr}), der ein Mass für die Ähnlichkeit von gemessenem und theoretischem Spektrum darstellt und für einfach, zweifach bzw. dreifach geladene Ionen nicht unter 1,25, 2,25 bzw. 3,5 liegen durfte. Genauere Angaben können Stauber et al. (2003) entnommen werden.

Zur Identifizierung der detektierten Peptide wurden folgende Datenbanken benutzt:

- eine Datenbank mit allen in der NCBI-Nucleotid-(nr)-Datenbank (Kap. B3) zu findenden Tomaten-DNA-Sequenzen
- eine Datenbank mit allen in der NCBI-Protein-(nr)-Datenbank zu findenden Tomaten-Proteinsequenzen

- und eine kleine Tomaten-EST-Datenbank, die generiert wurde, indem die NCBI-EST-Datenbank mit der cDNA-Sequenz des Lhca5 aus *A. thaliana* (GenBank Acc. Nr.: AF134121) durchsucht wurde.

Diese Datenbanken wurden so prozessiert, dass neben Phosphorylierungen auch eventuelle Acetylierungen an N-terminalen Peptiden oder Lysinresten (+ 42 kDa) und Carbamylierungen an N-terminalen Peptiden oder Arginin- bzw. Lysinresten (+ 43 kDa) der untersuchten Peptide detektiert werden konnten. Außerdem wurde die Carbamidomethylierung (+ 57 kDa) von Cysteinen bei der Auswertung in Betracht gezogen und zusätzlich nach Peptiden gesucht, die nur eine tryptische Schnittstelle haben, und damit dem N-Terminus bzw. C-Terminus entsprechen könnten.

3.6.3.2 Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie

Um das gesamte Molekulargewicht der in PSI- oder LHCI-Präparation enthaltenen Proteine zu untersuchen, wurden in Kooperation mit Prof. C. Huber (Institut für Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Universität des Saarlandes, Saarbrücken) in Zusammenarbeit mit H. Toll ESI-MS-Spektren aufgenommen. Dazu wurde ein Aliquot einer per SDG-UZ aufgereinigten PSI- bzw. LHCI-730- oder LHCI-680-Präparation etwa zehnfach mit ddH₂O verdünnt, ohne vorherigen Verdau auf einer HPLC-Säule (monolithische Kapillar-Säule, 60 mm Länge, 0,2 mm Innendurchmesser; siehe Premstaller et al., 2000) aufgetrennt und das Molekulargewicht der eluierten Proteine in einem Quadrupol-Elektrospray-Ionenfallen-Massenspektrometer (LCQ, Thermofinnigan, San Jose, CA, USA) bestimmt. Die gemessenen Molekularmassen wurden dann mit den theoretischen Molekularmassen der Lhca-Proteine (Tab. 2) verglichen und so den einzelnen Proteinen zugeordnet.

3.7 Deepoxidation nativer und rekombinanter Lichtsammelkomplexe

Die folgenden Versuche wurden in Kooperation mit Antje Wehner (AG Jahns, Institut für Biochemie der Pflanzen, Universität Düsseldorf) durchgeführt.

3.7.1 Isolation der Violaxanthin-Deepoxidase

Die verwendete Violaxanthin-Deepoxidase (VDE) wurde von A. Wehner nach der Methode von Arvidsson et al. (1996) aus Spinat isoliert. Kurz zusammengefasst wurden dazu Thylakoide zunächst durch Ultraschallbehandlung bei einem pH-Wert von 5,1 aufgebrochen. Die Ablösung der VDE von den resultierenden Membranfragmenten wurde dadurch erreicht, dass der pH bei der letzten Ultraschallbehandlung auf 7,2 erhöht wurde. Im Anschluß an die nachfolgende Zentrifugation wurde die im Überstand verbleibende VDE mittels Ammoniumsulfat ausgefällt und per Ultrazentrifugation pelletiert.

3.7.2 *In vitro*-Deepoxidation

Die *in vitro*-Deepoxidation wurden sowohl mit nativen Pigment-Protein-Komplexen (PSI und LHCI-Subfraktionen, siehe Kap. C1) als auch mit r-LHC aus Lhca1 bis Lhca4 durchgeführt. Die Rekonstitution erfolgte wie in Kap. C2.4 beschrieben. Es wurde jeweils 167 µg Apoprotein und

Pigmente entsprechend 200 µg Chl verwendet. Bei den Pigmentaliquots handelte es sich um eine Mischung aus Einzelpigmenten mit einem Chl *a/b*-Verhältnis von 3:1 und einem Chl/Car-Verhältnis von 6:1. Als Carotinoide wurden Lut und Vio im molaren Verhältnis von 1:1 eingesetzt. Dadurch erhielt man r-LHC, die als Xanthophylle lediglich Lut und Vio enthielten. Lut wurde verwendet, da es für die Bildung bzw. die Stabilität der gebildeten LHC notwendig ist. Durch Verwendung von Vio als einziges weiteres Carotinoid sollte erreicht werden, dass es in größerer Menge in die LHC eingebaut wird, und dadurch die Vio-Umsetzung durch die VDE besser beobachtet werden kann. Die r-LHC wurden per SDG-UZ aufgereinigt (Kap. C2.5) und die Chl-Konzentration (Kap. C3.1) und die Pigmentzusammensetzung (Kap. C3.3) bestimmt.

Die Deepoxidation wurde in 0,1 M Citratpuffer (pH 5,1) bei RT für 2 h durchgeführt. Für die Deepoxidierungsexperimente wurde jeweils soviel einer LHCI-Präparation (SDG-Bande) eingesetzt, dass die Vio-Konzentration im endgültigen Ansatz 100 nM war. Bei einer Ansatzgröße von 12 ml, wäre das ein Aliquot entsprechend 12 nmol Vio. Dabei ist zu beachten, dass die Detergensendkonzentration im Ansatz nicht über 0,002% (w/v) β -DM liegen darf. Das LHC-Aliquot wurde mit Monogalactosyl-Diacylglycerol (MGDG, gelöst in Methanol) versetzt, so dass sich ein molares Vio:MGDG-Verhältnis von 1:30 ergab. Dann wurde 400 µl VDE-Extrakt zugegeben und mit 0,1 M Citratpuffer (pH 5,1) auf ein Endvolumen von 12 ml aufgefüllt. Damit wurde das VDE-Extrakt 30fach verdünnt (diese Verdünnung hängt jedoch von der Aktivität des Extrakts ab, und muß für jede VDE-Präparation neu ermittelt werden). Die Deepoxidation wurde durch Zugabe von 1 M Ascorbat zu einer Endkonzentration von 30 mM gestartet. Zur Aufnahme von Kinetiken wurden zu definierten Zeitpunkten Aliquots entnommen und daraus sofort nach der Methode von Martinson und Plumley (1995) durch Zugabe von 2-Butanol die Pigmente extrahiert (siehe auch Kap. C3.3).

Im Anschluß an die Deepoxidation wurde der restliche Ansatz über Centrikons (Y10, Ausschlußgröße 10 kDa, Millipore, Eschborn) aufkonzentriert und die Pigment-Protein-Komplexe nochmals über SDG-UZ aufgereinigt. Es wurden SDG mit einem Volumen von 4 ml verwendet, die durch Einfrieren und Auftauen einer Lösung mit 0,4 M Saccharose, 5 mM Tricine/NaOH (pH 7,8), 0,06% (w/v) β -DM hergestellt wurden. Vor dem Probenauftrag (~ 500 µl) wurden die oberen 500 µl der Gradienten abgezogen. Nach der Zentrifugation für 16 h bei 54000 Upm im SW60Ti-Rotor (~ 392600 x g) wurden die pigmentierten Banden (FP und Pigment/Protein-Komplexe) abgenommen und jeweils die Pigmentzusammensetzung per HPLC analysiert (Kap. C3.3) und der Deepoxidationsgrad (DEPS) der Probe wie in Kap. A3.3 beschrieben bestimmt.

3.7.3 *In vivo*-Deepoxidation

Als Vergleich zu der *in vitro*-Deepoxidation wurden auch *in vivo*-Deepoxidationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden die Blätter von vier Wochen alten Tomatenpflanzen (siehe Kap. B5) geerntet und Lichtstress ausgesetzt, indem sie für eine Stunde bei 20 °C mit 1000 µE m⁻²s⁻¹ bestrahlt wurden. Im Anschluß wurde das Blattmaterial sofort auf Eis gekühlt. Dann wurden daraus Thylakoide, PSI und die LHCI-Subfraktionen isoliert (Kap. C1), deren Pigmentzusammensetzung bestimmt (Kap. C3.3) und der DEPS der verschiedenen Pigment-Protein-Komplexe berechnet (Kap. A3.3).

D Ergebnisse

1. Charakterisierung nativer LHCI-Subfraktionen

Im Gegensatz zu der äußeren Antenne des PSII, deren Proteinzusammensetzung und Pigmentgehalt genauestens untersucht ist (siehe Kap. A3.1, A3.2), ist über die Lichtsammelantenne des PSI nur wenig bekannt. Dies liegt zum einen daran, dass diese LHC in der Thylakoidmembran in geringeren Mengen vorkommen als die des PSII, von denen alleine der LHCIIb 50% der Chl-Menge der Thylakoidmembran ausmacht (Peter and Thornber 1991). Zum anderen ist die Isolation der LHCI-Komponenten schwieriger als die des LHCIIb und sie lassen sich nur als Mischfraktionen, die mindestens zwei unterschiedliche Lhca-Proteine enthalten, isolieren (siehe Kap. A2.2.1). Das Ziel der folgenden Versuche war es deshalb, das Pigment/Protein-Verhältnis und die Pigmentstöchiometrie der beiden LHCI-Subfraktionen LHCI-680 und LHCI-730 von Tomate zu bestimmen.

1.1 Isolierung und Identifizierung nativer LHCI-Subfraktionen

Die Aufreinigung von solubilisiertem PSI-LHCI-Holokomplex aus Tomate mittels SDG-UZ (Kap. C1.3) führte zur Auftrennung von vier pigmentierten Banden (Abb. 10).

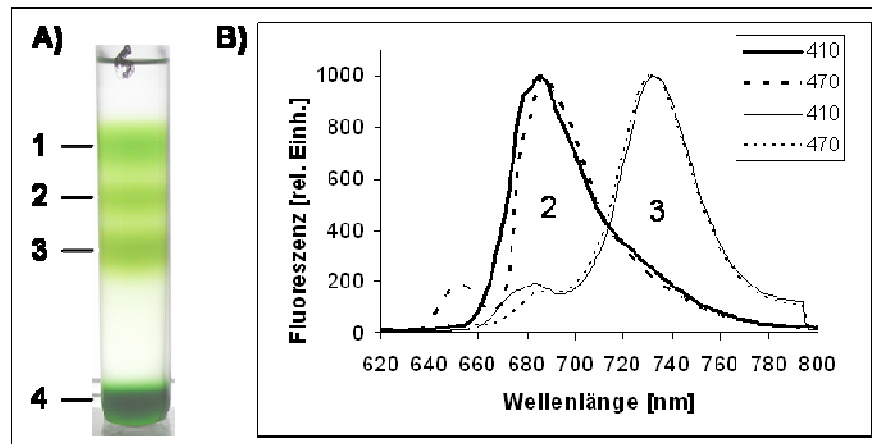


Abb. 10: Isolierung nativer LHCI-Subfraktionen. A) Bandenmuster von solubilisiertem PSI nach Auftrennung in Saccharosedichtegradienten. B) 77 K-Fluoreszenzemissionsspektren der beiden LHCI-Subfraktionen (Bande 2 bzw. 3) nach Anregung von Chl *a* bei 410 nm bzw. Chl *b* bei 470 nm. Die Kurven stellen Mittelwertspektren von 3-5 unabhängigen Messungen dar.

Bande 1 enthält ungebundene Pigmente („freies Pigment“). Die Banden 2 und 3 konnten aufgrund ihrer Tieftemperatur-Fluoreszenzemission (Kap. C3.2) den LHCI-Subfraktionen LHCI-680 und LHCI-730 zugeordnet werden. Bande 3 zeigte sowohl nach Chl *a*- als auch nach Chl *b*-Anregung ein Fluoreszenzemissionsmaximum bei 731 nm (Abb. 10B). Für Bande 2 lag das Maximum bei 687 bzw. 686 nm und es war eine Schulter bei 681 nm zu erkennen (Abb. 10B). Außerdem enthielt Bande 2 mehr ungekoppeltes Chl *b* als Bande 3, was an dem Peak bei ~650 nm nach Chl *b*-Anregung zu erkennen ist.

Die Proteinanalyse mittels denaturierender SDS-PAGE (Abb. 11A) bestätigte die Zuordnung der Banden zu den LHCI-Subkomplexen. So enthielt Bande 2 überwiegend Lhca2 und Lhca3, die Komponenten des LHCI-680, und nur Spuren anderer Lhc-Proteine, während in Bande 3 Lhca1 und Lhca4, die Bestandteile des LHCI-730, dominierten. Die Zuordnung der Proteinbanden zu den Lhca-Proteinen erfolgte hierbei aufgrund des theoretischen Molekulargewichts der Tomaten-Lhca (siehe Tab. 2) und des Laufverhaltens, das entsprechende überexprimierte Lhca-Proteine im gleichen Gelsystem zeigen (Schmid et al., 1997). Bande 4 enthält den PSI-Kernkomplex ohne LHCI-Proteine wie aus dem Vergleich der Proteinzusammensetzung mit der eines PSI-LHCI-Holokomplexes ersichtlich wird (Abb. 11A).

Im schwach denaturierenden Gel (Kap. C3.5.1.2) verhielten sich die Pigment-Proteinkomplexe des LHCI-680 wie Monomere, LHCI-730 lag dagegen eindeutig als Dimer vor (Abb. 11B). Interessanterweise konnte sowohl in PSI- als auch in LHCI-730-Präparationen, aber nicht in LHCI-680-Präparationen, regelmäßig eine zusätzliche Proteinbande im Molekulargewichtsbereich der Lhc-Proteine zwischen 20000 und 25000 aufgelöst werden (Abb. 11A, Stern). Auf die Identifikation dieser Bande wird in Kap. C4 näher eingegangen.

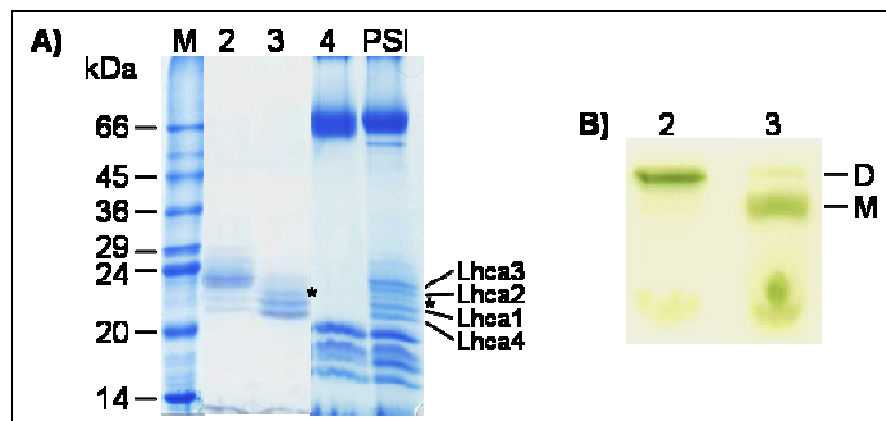


Abb. 11: Charakterisierung von nativen LHCI-Subfraktionen: Proteinzusammensetzung und Oligomerisierungsgrad. A) Die Dichtegradientenbanden 2-4 aus Abb. 10A wurden abgezogen und ihre Protein-zusammensetzung, sowie die einer PSI-Präparation, mittels denaturierender SDS-PAGE analysiert. Es wurden Aliquots entsprechend 2 µg Chl (Bande 2 und 3) bzw. 5 µg Chl (Bande 4 und PSI) aufgetragen. B) Zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades der in den LHCI-Banden enthaltenen Komplexe wurden 20 µl der etwa 10fach aufkonzentrierten Banden 2 und 3 für eine schwach denaturierende LDS-PAGE verwendet. D, Dimer; M, Monomer.

1.2 Pigmentzusammensetzung der nativen LHCI-Fractionen LHCI-730 und LHCI-680

Die Pigment/Protein-Stöchiometrien der beiden LHCI-Subfraktionen LHCI-680 und LHCI-730, wurden wie in Kap. C1.4 beschrieben ermittelt und sind in Tab. 18 zusammengestellt. Demnach binden die Proteine des LHCI-680 insgesamt neun Chl mit einem Chl *a/b*-Verhältnis von 2,5 (d.h. 6,4 Chl *a* und 2,6 Chl *b*) und etwa zwei Car (1,8), davon etwa ein Lut (0,92) und substöchiometrische Mengen an Vio (0,43) und β-Car (0,4). Die in LHCI-730 enthaltenen Lhca-Proteine ligieren etwa elf Chl, davon 8,4 Chl *a* und 2,9 Chl *b* und haben somit ein höheres

Chl *a/b*-Verhältnis (3,0) als die des LHCI-680. Wie LHCI-680 enthält LHCI-730 ebenfalls ein Lut pro Apoprotein (0,99) und substöchiometrische Mengen von Vio (0,54) und β -Car (0,42). Neo konnte weder in LHCI-680 noch in LHCI-730 nachgewiesen werden. Da sowohl in LHCI-680 als auch in LHCI-730 jeweils zwei unterschiedliche pigmentbindende Proteine enthalten sind, handelt es sich bei den ermittelten Werten um Mischwerte für Lhca2 und Lhca3 auf der einen (LHCI-680), und Lhca1 und Lhca4 auf der anderen Seite (LHCI-730).

Tab. 18: Pigmentzusammensetzung der nativen LHCI-Subfraktionen LHCI-680 und LHCI-730. Die Pigmente wurden über HPLC quantifiziert. Der Pigmentgehalt ist in mol Pigment / mol Apoprotein angegeben und stellt den Durchschnitt (\pm Standardabweichung) von drei unabhängigen LHCI-680- und fünf unabhängigen LHCI-730-Isolierungen dar. n.n., nicht nachweisbar.

Pigment	LHCI-680	LHCI-730
Neoxanthin	n. n.	n. n.
Violaxanthin	0,43 \pm 0,06	0,54 \pm 0,03
Lutein	0,92 \pm 0,03	0,99 \pm 0,04
Chlorophyll <i>b</i>	2,59 \pm 0,26	2,87 \pm 0,12
Chlorophyll <i>a</i>	6,40 \pm 0,48	8,55 \pm 0,36
β -Carotin	0,40 \pm 0,04	0,42 \pm 0,01
Gesamtchlorophyll	8,99 \pm 0,7	11,41 \pm 0,48
Chlorophyll <i>a/b</i>	2,48 \pm 0,14	2,98 \pm 0,02
Gesamtcarotinoide	1,76 \pm 0,06	1,94 \pm 0,04
Chlorophyll/Carotinoid	5,12 \pm 0,32	5,88 \pm 0,21

2. Deepoxidation nativer und rekonstituierter Pigment-Protein-Komplexe

Die Umwandlung von Vio zu Zea im Zuge des sogenannten Xanthophyllzyklus spielt eine wichtige Rolle beim Schutz des Photosyntheseapparates vor photooxidativer Schädigung. So ist in der Lichtsammelantenne des PSII die Bildung von Zea essentiell für die pH-abhängige Wärmedissipation überschüssiger Lichtenergie (Niyogi et al., 1998). Die Rolle von Zea in den LHC des PSI ist dagegen noch unklar. Nachdem sich bei den Pigmentuntersuchungen der nativen LHCI-Subfraktionen (Kap. D1.2) herausgestellt hatte, dass diese nennenswerte Mengen an Vio binden, stellte sich die Frage, ob bzw. in welchem Umfang dieser Vio-Pool durch die Vio-Deepoxidase (VDE) zu Zea umgesetzt werden kann, und ob das gebildete Zea von den LHC zurückgebunden werden kann, was als Voraussetzung für eine erhöhte Wärmedissipation angenommen wird.

Da es interessant wäre zu sehen, ob die Zugänglichkeit des Vio in den einzelnen LHCI-Untereinheiten unterschiedlich ist, wurden neben den nativen Pigment-Protein-Komplexen PSI, LHCI-680 und LHCI-730 (Kap. C1) auch die in Kap. D2.1 beschriebenen monomeren r-LHC

mittels eines *in vitro*-Deepoxidationssystems untersucht. Die Versuche wurden in Kooperation mit A. Wehner (AG Jahns, Institut für Biochemie der Pflanzen, Universität Düsseldorf) durchgeführt. Dabei wurden sowohl Deepoxidationskinetiken aufgenommen (Kap. D2.2.1) als auch die Pigmentzusammensetzung der Pigment-Protein-Komplexe vor und nach der Deepoxidation bestimmt. Aus diesen Pigmentdaten wurde der Deepoxidationsgrad (DEPS) berechnet und Rückschlüsse auf die Rückbindung von Zea gezogen (Kap. D2.2.2). Desweiteren wurde als Vergleich der DEPS von *in vivo* deepoxidierten nativen Pigment-Protein-Komplexen untersucht (Kap. D2.3).

2.1 Rekonstitution von Lichtsammelkomplexen mit Lutein und Violaxanthin als einzigen Carotinoiden

Die für die *in vitro*-Deepoxidation verwendeten r-LHC-Monomere (r-Lhca1 bis r-Lhca4) wurden mit einer Pigmentmischung rekonstituiert, die neben Chl *a* und Chl *b* als einzige Carotinoide Lut und Vio enthielt (Kap. C3.7.2). In Tab. 19 ist die Pigmentzusammensetzung der mittels SDG-UZ aufgereinigten r-LHC angegeben. In der PSI-Struktur wurden im Durchschnitt 12 Chl pro Lhca-Apoprotein gefunden (Ben-Shem et al., 2003). Davon ausgehend, dass r-LHC die gleiche Menge an Chl binden wie native LHC, wurden die für r-LHC gefundenen Pigmentdaten auf 12 Chl normiert und stellen somit den Pigmentgehalt eines LHCI-Monomers dar.

Aus Tab. 19 ist zu entnehmen, dass die verschiedenen r-Lhca unterschiedliche Mengen an Carotinoiden binden. In r-Lhca2 wurden 1,6 Lut und 0,6 Vio gefunden, d.h. Lhca2 ligiert etwa zwei Carotinoide. Das gleiche gilt für r-Lhca4, in dem 1,7 Lut und 0,5 Vio, also ebenfalls etwa zwei Carotinoide, gefunden wurden. r-Lhca3 bindet dagegen mindestens drei Carotinoide, davon 2,5 Lut und 0,9 Vio. Der Gesamtcarotinoidgehalt von r-Lhca1 liegt bei 2,5 (1,7 Lut und 0,8 Vio), d.h. ob Lhca1 zwei oder drei Carotinoide bindet, kann nicht eindeutig gesagt werden.

Tab. 19: Pigmentzusammensetzung der für die Deepoxidation verwendeten r-LHC. Für die Deepoxidationsexperimente wurden r-LHC hergestellt, die Lutein und Violaxanthin als einzige Carotinoide enthielten (siehe Kap. C3.7.2). Dargestellt ist der Pigmentgehalt dieser über SDG-UZ aufgereinigten LHC, der per HPLC bestimmt wurde. Alle Pigmentdaten wurden auf 12 Chl normiert. Die Daten entsprechen dem Durchschnitt (\pm Standardabweichung) von 6-10 unabhängigen Rekonstitutionen.

Pigment	Lhca1	Lhca2	Lhca3	Lhca4
Violaxanthin	0,81 \pm 0,12	0,58 \pm 0,11	0,88 \pm 0,23	0,46 \pm 0,14
Lutein	1,68 \pm 0,20	1,57 \pm 0,20	2,51 \pm 0,21	1,66 \pm 0,12
Chlorophyll <i>b</i>	2,97 \pm 0,14	3,41 \pm 0,23	1,96 \pm 0,25	3,46 \pm 0,26
Chlorophyll <i>a</i>	9,03 \pm 0,14	8,59 \pm 0,23	10,04 \pm 0,25	8,54 \pm 0,26
Gesamtchlorophyll	12	12	12	12
Chlorophyll <i>a/b</i>	3,05 \pm 0,20	2,54 \pm 0,27	5,17 \pm 0,75	2,49 \pm 0,28
Gesamtcarotinoide	2,49 \pm 0,24	2,14 \pm 0,20	3,39 \pm 0,38	2,12 \pm 0,21
Chlorophyll/Carotinoid	4,85 \pm 0,51	5,64 \pm 0,50	5,59 \pm 0,41	5,70 \pm 0,55

Außer einer unterschiedlichen Carotinoidbindekapazität besitzen die verschiedenen Lhca auch unterschiedliche Affinitäten für die Bindung von Vio. r-Lhca2 und r-Lhca4 enthalten substöchiometrische Mengen an Vio (0,6 bzw. 0,5 mol / mol Apoprotein), während r-Lhca1 und r-Lhca3 nahezu ein Vio pro Apoprotein binden (0,8 bzw. 0,9 mol / mol Apoprotein). Auch das Chl *a/b*-Verhältnis der verschiedenen LHCI-Monomere ist unterschiedlich. r-Lhca2 bindet 3,4 Chl *b* und 8,6 Chl *a* und r-Lhca4 3,5 Chl *b* und 8,5 Chl *a*. Damit haben beide ein relativ niedriges Chl *a/b*-Verhältnis von etwa 2,5. r-Lhca1 enthält drei Chl *b* und neun Chl *a*, was einem Chl *a/b*-Verhältnis von 3,0. entspricht. In r-Lhca3 ist der Chl *b*-Anteil am geringsten. Er weist ein ein hohes Chl *a/b*-Verhältnis von 5,2 auf und bindet damit etwa zwei Chl *b* und zehn Chl *a*.

2.2 *In vitro*-Deepoxidation

Die *in vitro*-Deepoxidationsexperimente (Kap. C3.7.2) wurden mit den nativen Pigment-Proteinkomplexen PSI, LHCI-680 und LHCI-730 (Kap. C1) und den in Kap. D2.1 beschriebenen r-LHC durchgeführt. Es wurde zunächst über einen Zeitraum von 2 h die Umwandlung von Vio zu Zea beobachtet (Kap. D2.2.1).

2.2.1 Deepoxidationskinetiken von Pigment-Protein-Komplexen

Als Referenz zu der Vio-Umsetzung in Pigment-Proteinkomplexen wurde die Umsetzung von nicht an Protein gebundenem (freiem) Vio untersucht.

Wie in Abb. 12 zu sehen ist, wurde dieses mit einer schnellen, einphasischen Kinetik innerhalb von 30 min fast komplett zu Zea umgewandelt.

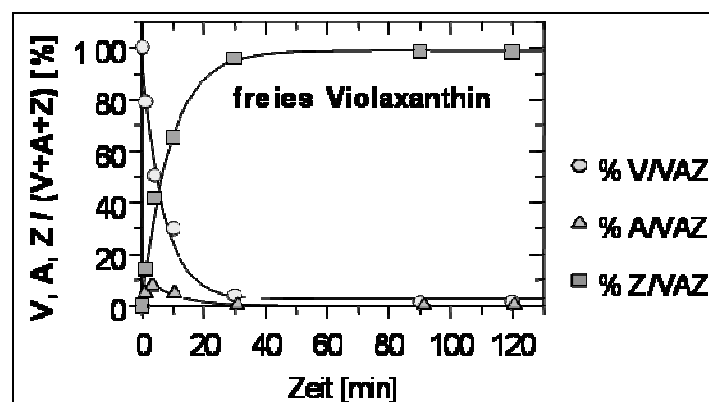


Abb. 12: Deepoxidationskinetik von freiem Violaxanthin. Die Kinetiken wurden wie in Kap. C3.7.2 beschrieben aufgenommen. V, Violaxanthin; A, Antheraxanthin; Z, Zeaxanthin; VAZ, Menge der am Xanthophyllzyklus beteiligten Pigmente.

Für die verschiedenen r-LHCI (Lhca1-4) ergaben sich unterschiedliche Umsetzungskinetiken (Abb. 13).

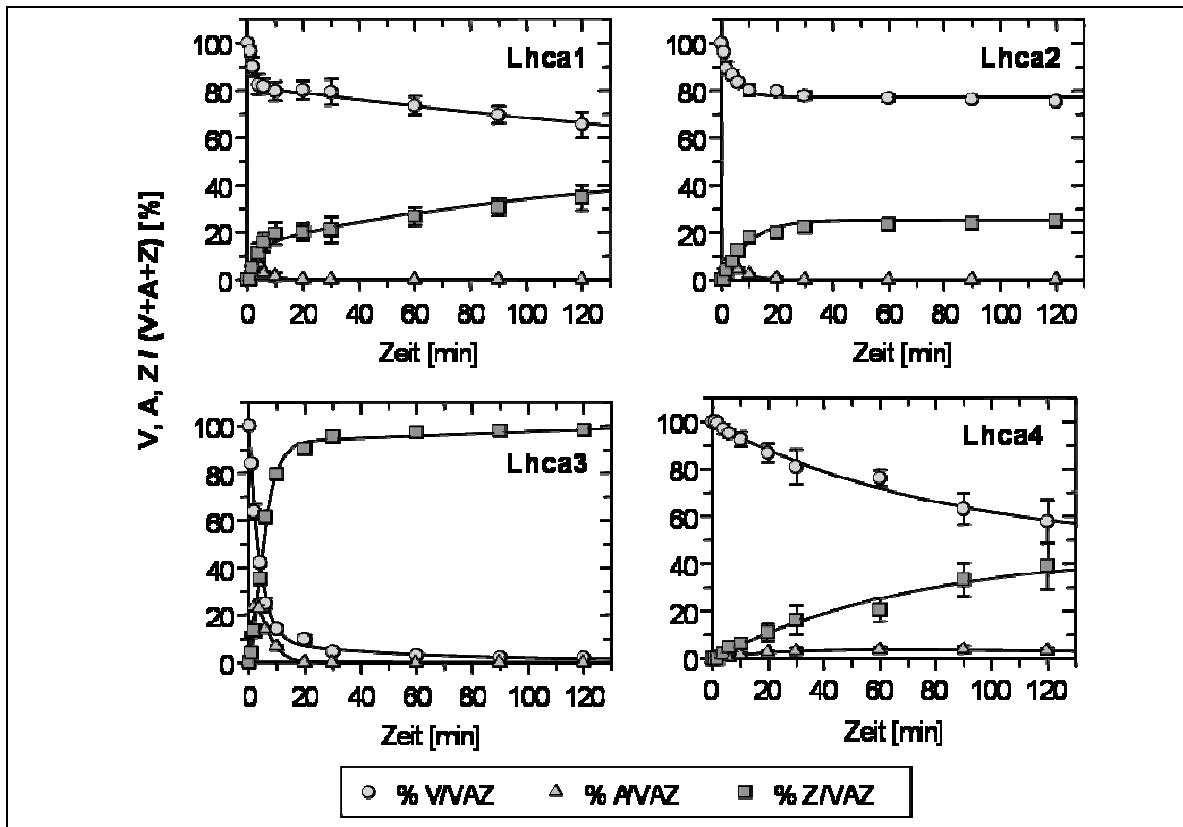


Abb. 13: Deepoxidationskinetiken rekonstituierter LHCI-Monomere. Es wurden per SDG-UZ aufgereinigte r-LHCI (Lhca1 bis Lhca4) untersucht, die als einzige Carotinoide Lutein und Violaxanthin enthielten (Kap. D2.1). Die Kinetiken wurden wie in Kap. C3.7.2 beschrieben aufgenommen und stellen den Durchschnitt (\pm Standardabweichung) von drei unabhängigen Experimenten dar. V, Violaxanthin; A, Antheraxanthin; Z, Zeaxanthin; VAZ, Menge der am Xanthophyllzyklus beteiligten Pigmente.

Die Kinetiken von Lhca1 und Lhca2 zeigten biphasische Verläufe. Ein Teil des mit Lhca1 und Lhca2 assoziierten Vio (~20%) wurde schnell (etwa vergleichbar mit freiem Vio) innerhalb von fünf bis zehn Minuten umgesetzt. Die Umsetzung des restlichen Vio erfolgte für Lhca1 mit einer langsameren Umsetzungsrate. Nach 2 h waren etwa 35% umgesetzt. Für Lhca2 konnte dagegen keine weitere Umsetzung mehr beobachtet werden. Im Gegensatz dazu, wurde das in Lhca3 gebundene Vio fast vollständig zu Zea umgewandelt, und zwar mit einer schnellen, einphasigen Kinetik vergleichbar mit der von freiem Vio. Für Lhca4 wurde wiederum eine völlig andere Umsetzungskinetik beobachtet. Die bei den anderen Lhca auftretende schnelle Phase fehlte hier völlig. Die Menge des umsetzbaren Vio war jedoch relativ hoch. Nach 2 h waren, mit einer etwa zehnmal langsameren Umwandlungsrate als sie für freies Vio zu sehen war, etwa 45% des Vio umgesetzt worden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die absolute Menge des innerhalb von 2 h umwandelbaren Vio in den vier r-LHCI unterschiedlich ist (Lhca2 ~20%, Lhca1 und Lhca4 ~35-40%, Lhca3 annähernd vollständige Umsetzung), und dass diese Umwandlung mit unter-

schiedlichen Geschwindigkeiten geschieht, und dass in Lhca1 und Lhca2 zwei Phasen mit unterschiedlichen Umwandlungsgeschwindigkeiten beobachtet wurden.

Als Vergleich zu den r-LHC wurden entsprechende *in vitro*-Deepoxidationsexperimente auch mit nativen Pigment-Protein-Komplexen durchgeführt, die wie in Kap. C1 beschrieben isoliert wurden (Abb. 14).

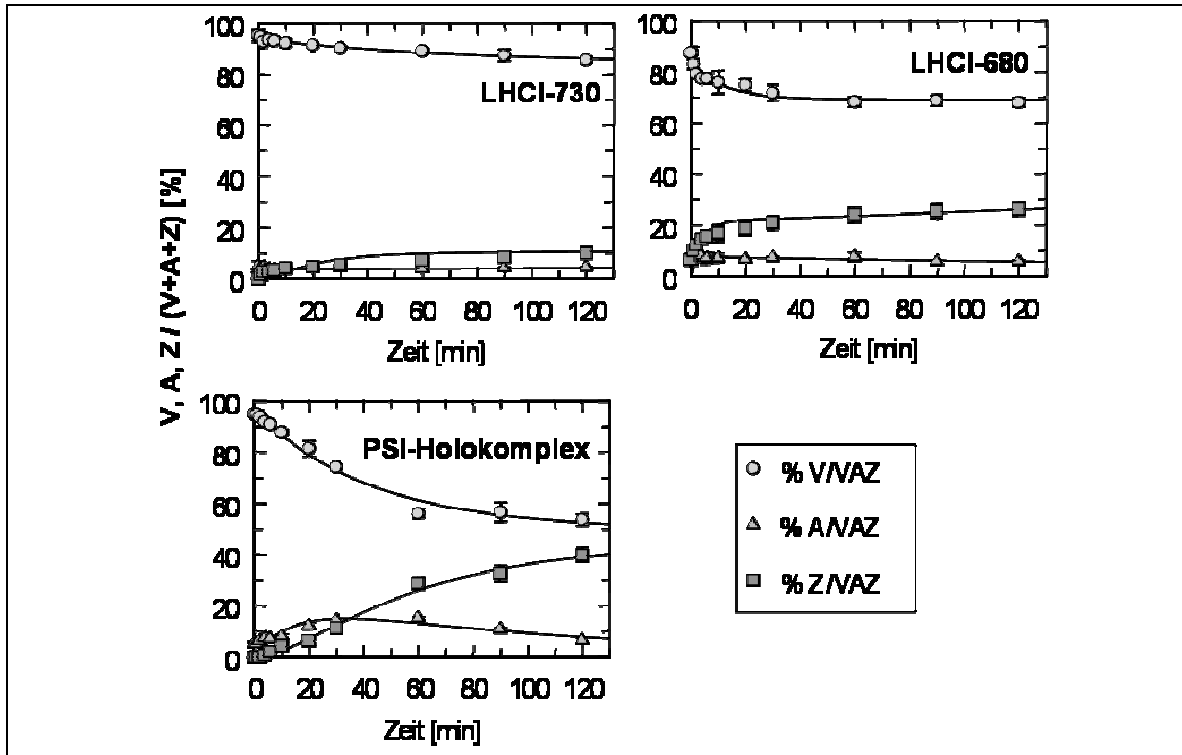


Abb. 14: Deepoxidationskinetik nativer Pigment-Protein-Komplexe. Es wurden die wie in Kap. C1 beschrieben isolierten nativen Pigment-Proteinkomplexe PSI, LHCI-730 und LHCI-680 untersucht. Die Kinetiken wurden wie in Kap. C3.7.2 beschrieben aufgenommen und stellen den Durchschnitt (\pm Standardabweichung) von drei unabhängigen Experimenten dar. V, Violaxanthin; A, Antheraxanthin; Z, Zeaxanthin; VAZ, Menge der am Xanthophyllzyklus beteiligten Pigmente.

Von dem in LHCI-730 gebundenen Vio konnte nur eine geringe Menge (~15%) umgesetzt werden. Dies geschah mit einer langsamen einphasigen Kinetik vergleichbar mit der des r-Lhca4. In LHCI-680 wurde ein größerer Anteil des gebundenen Vio (~30%) umgesetzt, wobei 10% davon allerdings schon zu Beginn des Experiments umgesetzt waren. Die Kinetik ist biphasisch und mit der von r-Lhca2 zu vergleichen. Die größte Menge an Vio (~50%) wurde im PSI-Holokomplex mit einer relativ langsamen Umwandlungsrate umgesetzt (Abb. 14). In allen nativen Pigment-Protein-Komplexen reicherte sich Antheraxanthin, das Zwischenprodukt des Xanthophyllzyklus stärker an als in den r-LHC, am auffälligsten ist dies in der PSI-Kinetik zu sehen.

2.2.2 Vergleich der Pigmentzusammensetzung vor und nach der Deepoxidation

Um Aussagen über den Xanthophyllzyklus machen zu können, ist es weiterhin wichtig zu wissen, ob das gebildete Zea wieder in den Pigment-Protein-Komplex zurückgebunden werden kann. Dazu wurde zunächst per HPLC (Kap. C3.3) die Pigmentzusammensetzung der Komplexe vor der Deepoxidation bestimmt. Dann wurde die *in vitro*-Deepoxidation durchgeführt. Zur Bestimmung der Pigmentzusammensetzung der Komplexe nach der Deepoxidation wurden die Deepoxidationsansätze aufkonzentriert und nochmals mittels SDG-UZ aufgereinigt (Kap. C3.7.2). Im Anschluß daran lagen bei den meisten Proben etwa 10-20% der Pigmente in der FP-Bande vor. Einzige Ausnahme war r-Lhca3, bei dem etwa zwei Drittel der Pigmente als FP vorkamen. Bei diesen Angaben handelt es sich um Abschätzungen, da die DG-Banden sehr diffus waren, und deshalb eine genaue Volumenbestimmung nicht möglich war. In Tab. 20 (folgende Seite) sind die per HPLC-Analyse (Kap. C3.3) ermittelten Pigmentzusammensetzungen der untersuchten Pigment-Protein-Komplexe und der FP-Banden vor und nach der *in vitro*-Deepoxidation, sowie die daraus berechneten DEPS (Kap. C3.7.2) zusammengefasst.

Der Vergleich der Pigmentzusammensetzung der rekonstituierten Komplexe vor und nach der Deepoxidation zeigt, dass diese durch die Experimente unterschiedlich beeinflusst wurden.

Für r-Lhca1 bleiben das Chl *a/b*-Verhältnis und das Lut/Chl-Verhältnis gleich, während das Chl/Car-Verhältnis und Lut/VAZ-Verhältnis sich verringern. Das bedeutet, dass verstärkt die Xanthophyllzyklus-Pigmente in den Komplex rückgebunden werden.

Ähnlich verhält sich r-Lhca2, nur dass dieser nach der Deepoxidation auch ein verringertes Chl *a/b*-Verhältnis aufweist, was darauf hindeutet, dass möglicherweise zusätzlich ein Chl *a* verloren geht. In beiden LHC ist der DEPS der Xanthophyllzyklus-Pigmente mit 0,27 bzw. 0,18 relativ gering. Dies bedeutet, dass Zea nicht verstärkt rückgebunden wird.

In r-Lhca3 dagegen bleibt das Chl *a/b*-Verhältnis gleich und das Chl/Car-Verhältnis verringert sich, während das Lut/Chl-Verhältnis und das Lut/VAZ-Verhältnis sich vergrößern. Dies und die große Menge an freiem Pigment (~65%) deutet darauf hin, dass Lhca3 während der Deepoxidation instabil wird, und beide Chl-Arten und überproportional Xanthophyllzyklus-Pigmente verliert. In r-Lhca3 wird allerdings unverhältnismäßig stark Zea rückgebunden, wie man aus dem hohen DEPS von 0,87 ableiten kann. Der DEPS von r-Lhca3 ist damit vergleichbar mit dem der FP-Banden (0,66 bis 0,96).

In r-Lhca4 verringern sich im Zuge der Deepoxidation das Chl *a/b*-Verhältnis und das Chl/Car-Verhältnis. Das Lut/Chl-Verhältnis bleibt gleich und das Lut/VAZ-Verhältnis steigt an. Dies bedeutet, dass Chl *a* verloren geht und etwas weniger Xanthophyllzyklus-Pigmente zurückgebunden werden als freigesetzt wurden. Allerdings ist der DEPS von Lhca4 immer noch relativ hoch (0,36), d.h. Zea wird verhältnismäßig gut rückgebunden.

Betrachtet man die nativen Pigment-Protein-Komplexe so fällt auf, dass ihre Pigmentzusammensetzung durch die Deepoxidation kaum beeinflusst wird. In LHCI-680 verringert sich lediglich das Chl *a/b*-Verhältnis leicht, in LHCI-730 ist ein etwas niedrigeres Chl/Car-Verhältnis zu sehen. Für den PSI-Holokomplex ist ein Verlust von Chl *b* zu beobachten (höheres Chl *a/b*-Verhältnis nach der Deepoxidation). Dies und das erhöhte Chl/Car-Verhältnis deuten auf eine Ablösung von LHCI-Monomeren vom PSI-Kern hin. Der Deepoxidationsgrad der nativen LHCI-

Subkomplexe ist mit 0,17 in LHCI-730 und 0,26 in LHCI-680 in beiden LHCI-Fractionen niedriger als aus dem Durchschnitt der DEPS der beiden entsprechenden r-Lhca zu erwarten wäre. Dieser läge für Lhca1 + Lhca4 bei 0,32 und bei Lhca2 + Lhca3 bei 0,53. Der DEPS des PSI-Holokomplex ist dagegen höher als in den LHCI-Fractionen (0,35). Dies lässt sich möglicherweise mit der „erleichterten“ Deepoxidation von unspezifisch an das PSI gebundenen VAZ-Molekülen erklären.

Tab. 20: Pigmentzusammensetzung der rekonstituierten bzw. nativen Pigment-Protein-Komplexe vor und nach der Deepoxidation. Die Pigmentstöchiometrien wurden per HPLC ermittelt und sind auf 12 Chl normiert. Die Werte der epoxidierten Proben wurden nach Rekonstitution bzw. Isolation der Pigment-Proteinkomplexe und Abtrennung des freien Pigments durch SDG-UZ vor Durchführung der Experimente ermittelt. Nach zweistündiger Deepoxidation wurden die Deepoxidationsansätze über Centrikons aufkonzentriert und die Komplexe erneut über SDG-UZ aufgereinigt. Die Zusammensetzung des freien Pigments wurde nur nach der Deepoxidation untersucht. Die Daten stellen jeweils den Durchschnitt (Standardabweichung <15%) von drei unabhängigen Experimenten dar. DEPS, Deepoxidierungsgrad. VAZ, Violaxanthin + Antheraxanthin + Zeaxanthin (= Summe der am Xanthophyllzyklus beteiligten Pigmente).

		Chl a/b	Chl/Car	Lut/Chl	Lut/VAZ	DEPS	Volumen ¹⁾ [%]
rekonstituierte LHC							
Lhca1	epoxidiert	2,86	4,60	0,16	2,70	0,00	
	deepoxidiert	2,97	4,09	0,16	2,01	0,27	90
	freies Pigment	2,92	3,29	0,24	3,61	0,85	10
Lhca2	epoxidiert	3,21	5,76	0,13	2,63	0,00	
	deepoxidiert	2,18	4,95	0,14	2,01	0,18	90
	freies Pigment	3,53	2,37	0,24	1,32	0,66	10
Lhca3	epoxidiert	4,64	3,46	0,20	2,13	0,00	
	deepoxidiert	4,41	2,77	0,33	5,37	0,87	35
	freies Pigment	2,88	1,58	0,40	1,90	0,89	65
Lhca4	epoxidiert	3,04	6,02	0,13	3,57	0,00	
	deepoxidiert	2,38	5,36	0,16	5,77	0,36	80
	freies Pigment	3,11	2,81	0,23	1,62	0,67	20
native Pigment-Protein-Komplexe							
LHCI-730	epoxidiert	2,76	6,08	0,12	2,03	0,02	
	deepoxidiert	2,82	5,67	0,12	2,11	0,17	>90
	freies Pigment	4,32	2,31	0,27	1,61	0,71	<10
LHCI-680	epoxidiert	2,73	5,27	0,13	2,45	0,12	
	deepoxidiert	2,24	5,39	0,13	2,37	0,26	80
	freies Pigment	4,19	1,72	0,40	2,20	0,86	20
PSI-Holo-komplex	epoxidiert	7,35	17,55	0,04	2,04	0,04	
	deepoxidiert	8,33	23,04	0,04	2,31	0,35	90
	freies Pigment	6,19	3,26	0,20	1,74	0,96	10

1) Relative Verteilung der Pigmente zwischen Pigment-Proteinkomplex- und freier Pigment-Bande nach Auftrennung des Deepoxidationsansatzes in Saccharosedichtegradienten im Anschluß an die Deepoxidation. Die Verteilung konnte lediglich abgeschätzt werden, da die DG-Banden sehr diffus waren und deshalb eine genaue Volumenbestimmung nicht möglich war.

2.3 *In vivo*-Deepoxidation

Um zu überprüfen, inwieweit die Ergebnisse der *in vitro*-Deepoxidation auf die Situation *in vivo* übertragen werden können, wurden Tomatenblätter für 1 h mit Starklicht bestrahlt, um eine Deepoxidation der Pigment-Protein-Komplexe zu induzieren (Kap. C3.7.3). Im Anschluß wurden die Blätter geerntet, native Pigment-Protein-Komplexe isoliert (Kap. C1), und deren Deepoxidationsgrad bestimmt.

Tab. 21 zeigt, dass der Deepoxidierungsgrad der nativen Pigment-Protein-Komplexe in der Reihenfolge PSI > LHCI-680 > LHCI-730 abnimmt. Außerdem ist klar zu erkennen, dass die DEPS aus den *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten sehr gut übereinstimmen, was zeigt, dass die Ergebnisse der *in vitro*-Versuche für die einzelnen r-LHCI-Monomere aussagekräftig sind.

Tab. 21: Vergleich des Deepoxidierungsgrades von *in vitro* bzw. *in vivo* deepoxidierten nativen Pigment-Proteinkomplexen. Die *in vitro*-Daten entsprechen dem DEPS der Pigment-Proteinkomplexe nach 120 min Deepoxidation und anschließender Aufreinigung über SDG-UZ (Tab. 20). Für die Ermittlung der *in vivo*-Daten wurden die entsprechenden Pigment-Proteinkomplexe aus starklichtbehandelten Tomatenpflanzen isoliert (1 h bei $1000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und der Deepoxidierungsgrad bestimmt. Es handelt sich um den Durchschnitt von 3-4 unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung liegt unter 8%.

Proteinkomplex	Deepoxidierungsgrad (DEPS)	
	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
LHCI-730	0,18	0,17
LHCI-680	0,25	0,26
PSI-Holokomplex	0,29	0,35

3. Versuche zur Dimerisierung von Lhca2 und Lhca3

Die verschiedenen Mitglieder der Lhc-Proteinfamilie unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit zur Bildung von Oligomeren (Kap. A2.2.1). Wie in Kap. D1.1 dargestellt lassen sich native Pigment-Protein-Komplexe von Lhca2 und Lhca3 lediglich als eine Mischfraktion aus monomerem Lhca2- und Lhca3 isolieren (LHCI-680) (Abb. 10). Es gibt allerdings gute Hinweise darauf, dass Lhca2 und Lhca3 *in vivo* als Homo- oder Heterodimere vorliegen (Jansson et al., 1996; Croce und Bassi 1998, Ihalainen 2000; Ganeteg et al., 2001) und die Monomerisierung eine Folge der LHCI-Isolierung ist.

Um das Oligomerisierungsverhalten der beiden Apoproteine des LHCI-680 näher zu untersuchen, wurden *in vitro*-Rekonstitutionen (Kap. D3.1) mit Kombinationen der beiden LHCI-680-Apoproteine (Lhca2 und Lhca3) durchgeführt. Vergleichbare Untersuchungen wurden auch schon zur Untersuchung der Dimerisierung von Lhca1 und Lhca4 verwendet (Schmid et al., 1997; Schmid et al., 2002b). Außerdem wurden Kombinationen aus Lhca2 oder Lhca3 mit Lhca1 und Lhca4 verwendet, um mögliche Interaktionen zwischen den LHCI-680- und den LHCI-730-Apoproteinen zu erfassen. Da sich bei den Dimerisierungsversuchen mit Lhca1 und

Lhca4 herausgestellt hatte, dass Lipide, speziell Phosphatidylglycerol (PG), an deren Dimerisierung beteiligt sind (Schmid et al., 1998) wurde auch der Einfluß von Lipiden auf die Dimerisierung von Lhca2 und Lhca3 getestet (Kap. D3.2). Außerdem wurde untersucht, ob zweiwertige Kationen (Kalzium und Magnesium) Einfluß auf die Dimerisierung von Lhca2 und Lhca3 haben (Kap. D3.3).

3.1 Gemeinsame Rekonstitution von Lhca2 und Lhca3 und in Kombination mit Lhca1 und Lhca4

Die Dimerisierung von Lhca1 und Lhca4 kann *in vitro* auf zwei Wegen erreicht werden. Zum einen können beide Apoproteine in einem Rekonstitutionsansatz gemischt und gemeinsam rekonstituiert werden, zum anderen bilden sich Dimere, wenn bereits fertig rekonstituierte Lhca1- und Lhca4-Monomere zusammengegeben werden (Schmid et al., 2002b). Zur Dimerisierung von Lhca2 und Lhca3 wurden beide Methoden ausprobiert. Sie führten jedoch beide zu dem gleichen, in Abb. 15A+B dargestellten Ergebnis. Die Aufreinigung der Rekonstitutionsansätze erfolgte sowohl mittels schwach denaturierender Gelelektrophorese (Kap. C3.5.1.2) als auch über noch schonendere SDG-UZ (Kap. C2.5).

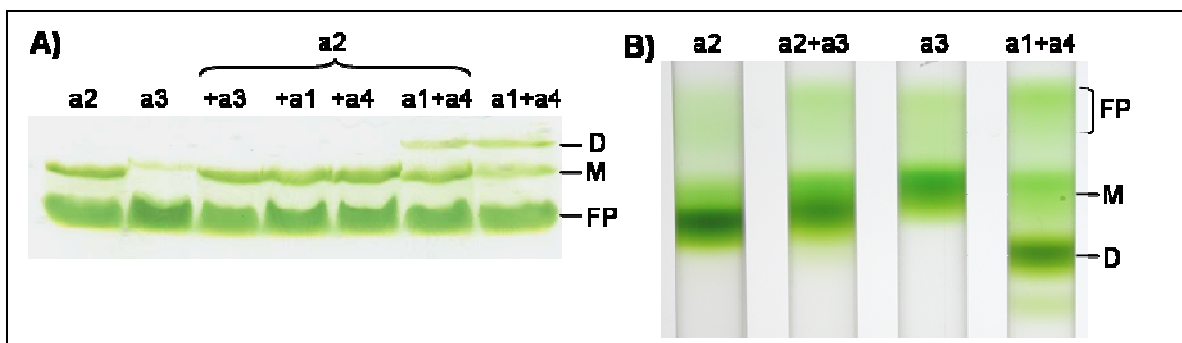


Abb. 15: Untersuchung des Oligomerisierungsverhaltens der LHCI-680-Proteine Lhca2 und Lhca3 anhand schwach denaturierender LDS-Gele und Saccharosedichtegradienten. Die Rekonstitutionen wurden mit Totalextrakt durchgeführt. Es wurde entweder Lhca2 oder Lhca3 alleine oder eine Kombination aus den angegebenen Lhca-Proteinen verwendet. Abb. A) zeigt das Bandenmuster nach Trennung der Rekonstitutionsansätze mittels schwach denaturierender LDS-Gelelektrophorese. In Abb. B) wurden entsprechende Ansätze in Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. FP, freies Pigment; M, Monomere; D, Dimere; a1-a4, Lhca1 bis Lhca4.

Es wurden weder für Lhca2 (a2) noch für Lhca3 (a3) in schwach denaturierenden Gelen (Abb. 15A) oder SDG (Abb. 15B) Banden beobachtet, die ein dem LHCI-730 vergleichbares Migrationsverhalten zeigten (a1+a4, untere Bande), und damit auf die Bildung von von Lhca2- oder Lhca3-Homodimeren hinweisen würden. Genauso wenig war bei Kombination der beiden Proteine (a2+a3) die Bildung von Lhca2/Lhca3-Heterodimeren zu beobachten. Zusätzlich zur gemeinsamen Rekonstitution wurden Lhca3 und Lhca2 auch in Gegenwart von Lhca1 und Lhca4 rekonstituiert, um zu überprüfen ob möglicherweise eine Interaktion mit einem dieser Proteine stattfindet. Auch hierbei konnten für beide Proteine in schwach denaturierenden Gelen keine Dimere aufgetrennt werden. In Abb. 15A (mittlere Spuren) ist dies exemplarisch für Lhca2 dargestellt.

Da es keinen Unterschied machte, ob die Proteine vor oder nach der Rekonstitution gemischt wurden, wurde in allen folgenden Versuchen so vorgegangen, dass Lhca2 und Lhca3 getrennt rekonstituiert und erst im Anschluss im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Weitere der Dimerisierung potentiell förderliche Komponenten (Lipide, Ionen) wurden nach der Rekonstitution in den angegebenen Konzentrationen oder Mengen zugegeben und der gesamte Ansatz nochmals 30 min inkubiert.

3.2 Einfluß von Lipiden auf die Dimerisierung von Lhca2 und Lhca3

Um den Einfluß von Lipiden auf die Dimerisierung von Lhca2 und Lhca3 zu untersuchen, wurden zunächst Versuche mit einer aus Erbsenblättern isolierten Lipidmischung durchgeführt. Die Lipidmischung wurde freundlicherweise von S. Boggasch (AG Paulsen, Institut für Allgemeine Botanik, Universität Mainz) zur Verfügung gestellt und enthielt bis auf MGDG die Lipide der Thylakoidmembran in der folgenden Stöchiometrie: 62% Digalactosyl-Diacylglycerol (DGDG), 21% PG und 17% Sulfolipid. Als zweite Variante wurde als einziges Lipid kommerziell erhältliches PG (Sigma) verwendet.

Vor der Auftrennung in schwach denaturierenden Gelen (33 µg Protein) (Kap. C3.5.1.2) wurde den Rekonstitutionsansätzen zwischen 4 µg und 150 µg der oben beschriebenen Lipidmischung zugegeben (Abb. 16A). Bei der Auftrennung über SDG-UZ (167 µg Protein) betrug der Lipidgehalt in den Ansätzen zwischen 20 µg und 600 µg (Abb. 16B). Geht man für Lhca2 und Lhca3 von einem mittleren Molekulargewicht von 23500 aus, und nimmt für die Lipidmischung ein Durchschnittsmolekulargewicht von 800 an, lagen die molaren Lipid/Protein-Verhältnisse damit zwischen 3,5 und 134 bzw. 3,5 und 110.

Die Bildung von Lhca2/Lhca3-Dimeren konnte in keinem der Ansätze beobachtet werden (Abb. 16A+B). Jedoch hatte der Lipidgehalt Einfluß auf die Ausbildung von zwei distinkten pigmentierten Banden in SDG (Abb. 16B). Je höher der Gehalt an Lipiden, desto besser ließen sich die beiden Banden trennen.

Die Analyse dieser Banden per SDS-PAGE ergab, dass sich deren Proteinzusammensetzung mit steigender Lipidmenge veränderte (Abb. 16C). Bei Zunahme des molaren Lipid/Protein-Verhältnisses von 0 auf 50 nahm der relative Gehalt an Lhca3 in der unteren Bande ab, während in den oberen Banden beide Proteine in etwa gleicher Menge vorlagen. Bei einem molaren Lipid/Protein-Verhältnis von 100 war in beiden Banden kaum noch Lhca3 zu finden

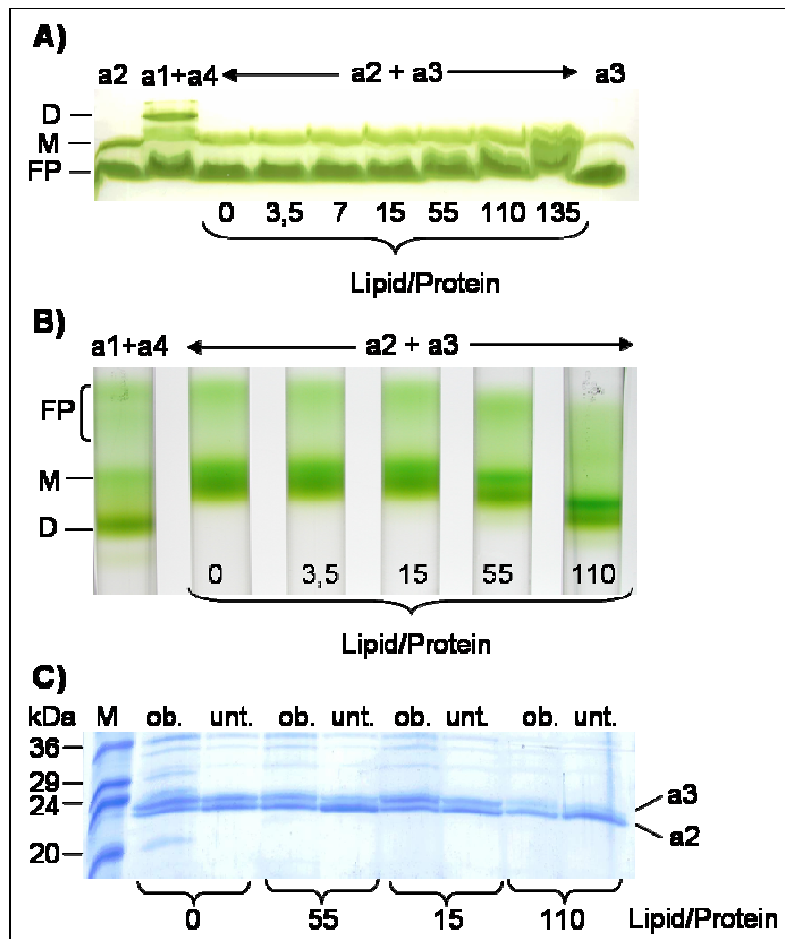


Abb. 16: Einfluss von Lipiden auf das Oligomerisierungsverhalten der LHCI-680-Proteine Lhca2 und Lhca3. Die Rekonstitutionen wurden mit Totalextrakt durchgeführt und im Anschluß das angegebene Lipid/Proteinverhältnis eingestellt. Es wurde entweder Lhca2 oder Lhca3 alleine oder eine Kombination aus den angegebenen Lhca-Proteinen verwendet. Abb. A) zeigt das Bandenmuster nach Trennung der Rekonstitutionsansätze mittels schwach denaturierender LDS-Gelelektrophorese. In Abb. B) wurden entsprechende Ansätze in Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. Abb. C) zeigt die Proteinzusammensetzung der DG-Banden aus Abb. B) nach Auftrennung in einem denaturierenden PAA-Gel. FP, freies Pigment; M, Monomere; D, Dimere; a1-a4, Lhca1 bis Lhca4, ob., obere Bande; unt., untere Bande.

Auch die Verwendung von 25-150 μg reinem PG (Suspension in dH_2O) als „dimerisierungsförderndes“ Lipid (entsprechend einem molaren Lipid/Protein-Verhältnis von 4,5 bis 25) resultierte nicht in der Bildung von Dimeren. Es konnten, wie die schonende Auftrennung in SDG zeigte, keine Dimerbanden aufgetrennt werden (Abb. 17). Dabei spielte es keine Rolle, ob das Lipid während des Rekonstitutionsvorganges anwesend war (mit X gekennzeichneten Gradient in Abb. 17) oder erst im Anschluss an die Rekonstitution zu der Probe gegeben wurde.

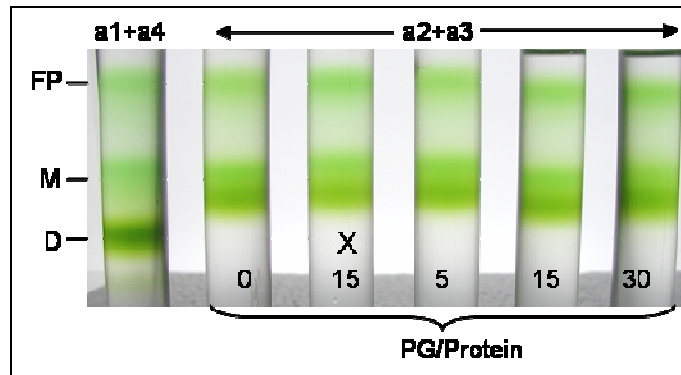


Abb. 17: Einfluss von Phosphatidylglycerol auf das Oligomerisierungsverhalten der LHCI-680-Proteine Lhca2 und Lhca3. Die Rekonstitutionen wurden mit Totalextrakt und mit den angegebenen molaren PG/Protein-Verhältnissen durchgeführt. Es wurde entweder Lhca2 oder Lhca3 alleine oder eine Kombination aus den angegebenen Lhca-Proteinen verwendet und die Ansätze in Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. FP, freies Pigment; M, Monomere; D, Dimere; a1-a4, Lhca1 bis Lhca4; PG, Phosphatidylglycerol; X, Zugabe von PG vor der Rekonstitution.

3.3 Einfluß von zweiwertigen Kationen auf die Dimerisierung von Lhca2 und Lhca3

In den folgenden Versuchen sollte der Einfluss von Kalzium und Magnesium auf die Dimerisierung von Lhca2 und Lhca3 untersucht werden. Die beiden Proteine wurden wiederum getrennt rekonstituiert, im Anschluss daran im Verhältnis 1:1 gemischt und 1 M CaCl_2 oder 1 M MgCl_2 zu Endkonzentrationen zwischen 1 mM und 30 mM CaCl_2 bzw. 5 mM und 100 mM MgCl_2 zugegeben.

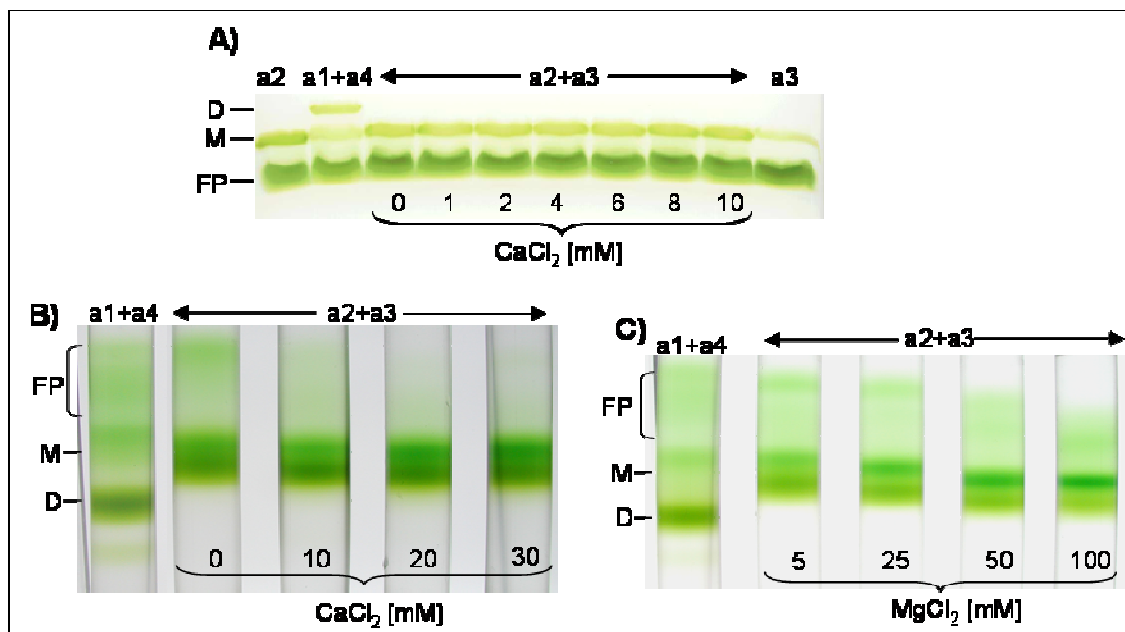


Abb. 18: Einfluß von Kalzium bzw. Magnesium auf das Oligomerisierungsverhalten der LHCI-680-Proteine Lhca2 und Lhca3. Die Rekonstitutionen wurden mit Totalextrakt und mit den angegebenen CaCl_2 - bzw. MgCl_2 -Konzentrationen durchgeführt. Es wurde entweder Lhca2 oder Lhca3 alleine oder eine Kombination aus den angegebenen Lhca-Proteinen verwendet. Abb. A) zeigt das Bandenmuster nach Auftrennung der Rekonstitutionsansätze mit CaCl_2 mittels schwach denaturierender LDS-Gelelektrophorese. In Abb. B) wurden entsprechende Ansätze in Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. Abb. C) zeigt Rekonstitutionsansätze mit MgCl_2 nach Auftrennung in Saccharosedichtegradienten. FP, freies Pigment; M, Monomere; D, Dimere; a1-a4, Lhca1 bis Lhca4.

Wie schon die Zugabe von Lipiden (Kap. D3.2) führte auch die Gegenwart von zweiwertigen Kationen weder in schwach denaturierenden LDS-Gelen noch in SDG zur Ausbildungen von Lhca2/Lhca3-Dimeren (Abb. 18A+B). Allerdings trennten sich sowohl bei Kalzium- als auch bei Magnesiumzugabe die beiden in SDG auftretenden Banden mit steigender Salzkonzentration besser von einander ab, ähnlich wie es auch in den Lipid-Versuchen zu beobachten war (Kap. D3.2).

Die Proteinanalyse der beiden SDG-Banden per denaturierender SDS-PAGE ergab, dass sich in Gegenwart von Kalzium Lhca3 in der oberen und Lhca2 in der unteren Bande anreichte, während in Gradienten ohne Kalzium in beiden Banden Lhca2 und Lhca3 in äquimolaren Mengen vorkamen. Dies ist in Abb. 19A exemplarisch für eine CaCl_2 -Konzentration von 30 mM gezeigt. Bei Erhöhung der Magnesiumkonzentration von 5 mM auf 100 mM verschwand Lhca3 sogar vollständig aus der unteren Bande, während in der oberen Bande das Lhca2/Lhca3-Verhältnis etwa 1:1 betrug (Abb. 19B).

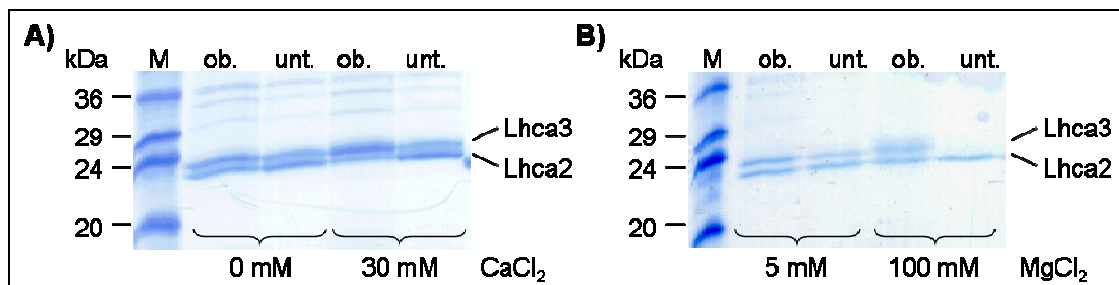


Abb. 19: Proteinzusammensetzung ausgewählter Dichtegradientbanden aus Abb. 18. Abb. A) zeigt ein mit Coomassie gefärbtes PAA-Gel, in dem jeweils die obere und untere Bande der Gradienten mit der angegebenen CaCl_2 -Konzentration aus Abb. 18A aufgetrennt wurden. In Abb. B) wurden entsprechend die Banden der Gradienten mit der angegebenen MgCl_2 -Konzentration aus Abb. 18B per SDS-PAGE aufgetrennt. ob., obere Bande; unt., untere Bande; M, Molekularmassenstandard.

4. Untersuchungen zur Proteinzusammensetzung des LHCI

Die Anzahl der in höheren Pflanzen durch Genomanalysen gefundenen Gene, die für potentielle LHCI-Proteine codieren, übersteigt die Anzahl der bisher beschriebenen Lhca-Proteine. So gibt es im Genom von Tomate Sequenzen für Isoformen von Lhca1 (*cab6a* und *cab6b*; Pichersky et al., 1987a) und Lhca4 (*cab11* und *cab12*; Schwartz et al., 1991), während in *A. thaliana* die cDNA für zwei zusätzliche potentielle Lhca-Proteine kloniert werden konnte (*Lhca5* und *Lhca6*; Jansson, 1999). Außerdem lassen sich unter geeigneten Elektrophoresebedingungen im LHCI-Bereich von PSI-Präparationen aus Tomate (Abb. 11A) und Gerste (Knoetzel et al., 1992) fünf Proteinbanden auflösen, denen bisher nur vier beschriebene Lhca-Proteine gegenüberstehen. Diese Befunde deuten darauf hin, dass der LHCI höherer Pflanzen komplexer zusammengesetzt sein könnte als bisher angenommen. Im Folgenden wird es deshalb zunächst darum gehen, die zusätzlich auftretende fünfte Proteinbande zu charakterisieren und im Anschluß daran die Proteinzusammensetzung des LHCI mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese weiter zu untersuchen.

4.1 Auftrennung von Tomaten-PSI in eindimensionalen Polyacrylamidgelen

Bei der Proteinanalyse von PSI- und LHCI-730-Präparationen mittels SDS-PAGE trat regelmäßig eine fünfte Bande im Molekulargewichtsbereich der LHCI-Proteine auf (Kap.D1.1). Die Trennung der einzelnen Banden war in dem standardmäßig verwendeten Minigel-Elektrophoresesystem jedoch nicht optimal. Deshalb sollte zunächst durch Variation der Elektrophoreseparameter die Auftrennung verbessert, und im Anschluß die Zusammensetzung der einzelnen LHCI-Banden, speziell der zusätzlichen Bande, untersucht werden.

4.1.1 Verbesserung der Auftrennung von PSI-Untereinheiten in Polyacrylamidgelen

Zunächst wurde in diskontinuierlichen Minigelen mit einer maximalen Trennstrecke von 6 cm die PAA-Konzentration des Trenngels variiert. Es wurden Konzentrationen zwischen 10% und 20% verwendet. Die Ergebnisse hierzu sind in Abb. 20 A zu sehen. Die beste Auftrennung konnte bei PAA-Konzentrationen zwischen 14% und 18% erzielt werden. Im Anschluss wurde die Länge der Auftrennungsstrecke verändert, indem PAA-Gele mit einer maximalen Trenngelänge von 16 cm (Maxigel) verwendet wurden. Hierbei wurde zusätzlich die Konzentration des Trenngels variiert (Abb. 20 B). Die beste Auftrennung ergab sich in Trenngelen mit einem linearen PAA-Gradienten von 14-20%. Abb. 20 C zeigt ein solches Gel, in dem unterschiedliche PSI-Präparationen aufgetrennt wurden. Die aufgetrennten Proteine hatten apparente Molekularmassen von 22,0, 22,3, 22,7, 23,2 und 23,7 kDa. Es ist zu erkennen, dass die zusätzliche Bande bei 22,7 kDa in jeder Präparation auftritt, wenn auch mit unterschiedlicher Intensität.

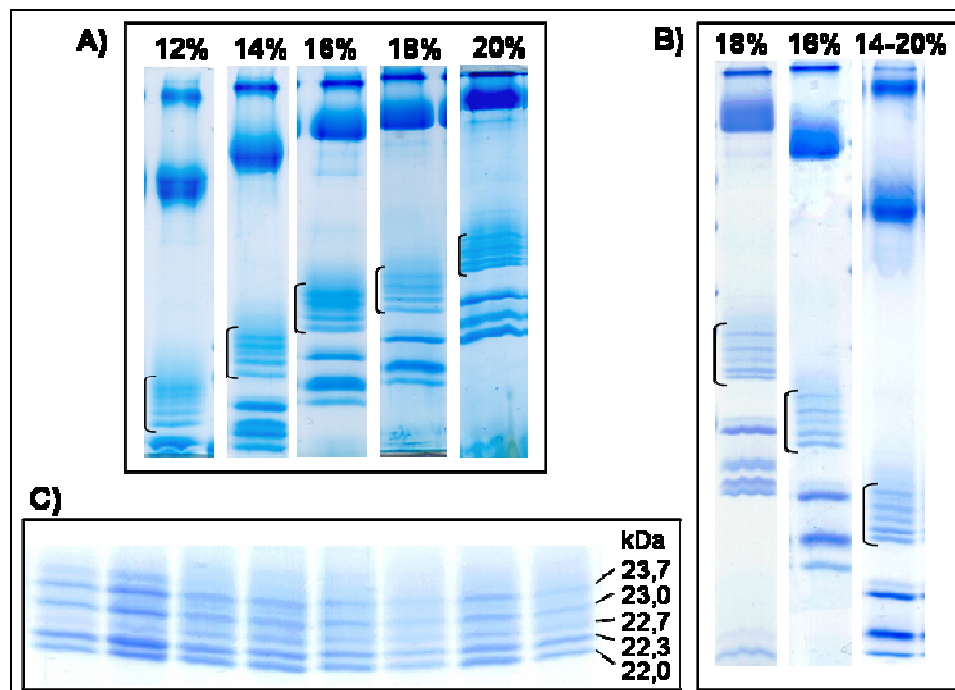


Abb. 20: Verbesserung der Proteinauftrennung des LHCI-Molekulargewichts-Bereiches in PAA-Gelen. In A) ist die Auftrennung von PSI-Präparationen in PAA-Gelen mit 6 cm Trennstrecke (Minigel) und unterschiedlichen PAA-Konzentrationen (12-20%) zu sehen. In B) wurden zur Auftrennung Gele mit einer Trennstrecke von 16 cm (Maxigel) und PAA-Konzentrationen von 16 und 18% bzw. mit einem linearen PAA-Gradienten von 14-20% verwendet. C) zeigt die optimierte Auftrennung verschiedener PSI-Präparationen in einem Maxigel mit 14-20%igem PAA-Gradienten. Die Klammern umspannen den Bereich der LHCI-Proteine.

4.1.2 Untersuchung der PSI-Proteinzusammensetzung durch Detektion mit Lhca-Antikörpern

Nachdem die Auftrennung der Proteinbanden im LHCI-Molekulargewichtsbereich optimiert worden war, wurde die Proteinzusammensetzung der einzelnen Banden mittels Westernblot und anschließender Immundetektion (Kap. C3.6.2) untersucht. Dafür wurden Antikörper (AK) gegen Peptide von Lhca1 bis Lhca4 verwendet (siehe Kap. C3.6.2.3, Tab. 14).

In Abb. 21 ist zu erkennen, dass die gegen Lhca2 und Lhca3 gerichteten AK jeweils eine Bande bei 23,2 bzw. 23,7 kDa detektierten. Dies entspricht in etwa dem theoretischen Molekulargewicht der beiden Apoproteine (Tab. 2). Die anderen beiden AK reagierten jeweils mit mehreren Banden, allerdings war die Reaktion unterschiedlich stark. Der anti-Lhca4-AK reagierte stark mit der Bande bei 22,0 kDa, aber auch mit dem unteren Bereich der 22,3 kDa Bande, während der Lhca1-AK drei distinkte Banden detektierte. Am stärksten war hierbei die Reaktion mit der 22,3 kDa Bande, aber auch die zusätzliche Bande bei 22,7 kDa und der untere Bereich der 23,2 kDa Bande wurden angefärbt.

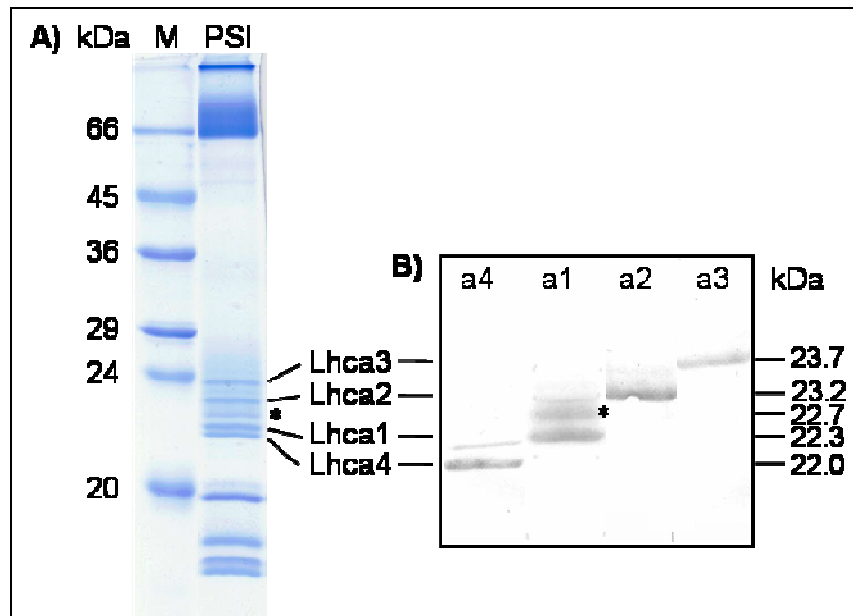


Abb. 21: Zuordnung der Proteinbanden im LHCI-Bereich zu Lhca-Proteinen mittels Westernblot. In A) ist die Proteinzusammensetzung einer PSI-Präparation im hochauflösenden PAA-Gel angefärbt mit Coomassie zu sehen. Die fünfte, zusätzliche Proteinbande ist mit einem Stern markiert. M, Molekularmassenstandard. Abb. B) zeigt den entsprechenden Immunoblot dekoriert mit Antikörpern gegen Lhca1 bis Lhca4 (a1-a4).

Um auszuschließen, dass es sich bei den detektierten Reaktionen um Kreuzreaktionen des Lhca1- bzw. Lhca4-AK mit anderen Lhca-Proteinen handelt, wurde die Spezifität dieser AK durch Westernblots mit Lhca1-, Lhca2- und Lhca4-IB-Präparationen überprüft (Abb. 22). Dabei stellte sich heraus, dass weder der Lhca1- noch der Lhca4-AK mit einem der anderen Lhca-Proteine kreuzreagierte. Übertragen auf die Ergebnisse der Westernblots in Abb. 21 bedeutet dies, dass Lhca4 und Lhca1 in PSI-Präparationen in zwei elektrophoretisch unterschiedlichen Formen vorkommen, und dass die zusätzliche Bande bei 22,7 kDa, soweit dies per Westernblot untersucht werden kann, eine Lhca1-Isoform enthält.

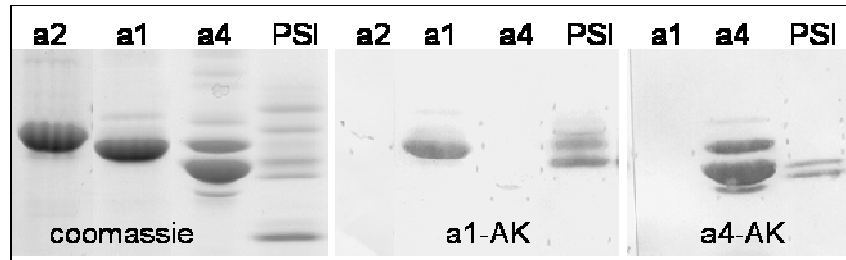


Abb. 22: Überprüfung der Spezifität des anti-Lhca1- und anti-Lhca4-Antikörpers. Gezeigt wird ein Coomassie gefärbtes PAA-Gel mit PSI und Lhca1-, Lhca2- und Lhca4-IB-Präparationen und die dazugehörigen Westernblots, die entweder mit anti-Lhca1 oder anti-Lhca4 Antikörper inkubiert wurden. a1, Lhca1; a2, Lhca2; a4, Lhca4; AK, Antikörper.

4.1.3 Massenspektrometrische Untersuchung der Proteinzusammensetzung des Photosystem I nach Auftrennung in eindimensionalen Gelen

Nachdem die Westernblots ergeben hatten, dass die Proteinbanden des LHCI-Bereiches teilweise mehrere Apoproteine enthalten, wurde als sensitivere Proteinnachweismethode die Tandem-Massenspektrometrie (Kap. C3.6.3.1) benutzt, um die Zusammensetzung der Banden detailliert zu untersuchen. Dazu wurde PSI in PAA-Gradientengelen (Kap. C3.5.1.1) aufgetrennt, die einzelnen Banden ausgeschnitten, tryptisch verdaut und ihre Proteinzusammensetzung massenspektrometrisch untersucht (Kap. C3.6.3.1). Die Ergebnisse sind in Tab. 22 zusammengestellt. Die Bezeichnung der Banden entspricht dabei der in Abb. 21.

Die MS/MS-Messungen wurden am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Universität Jena im Labor von PD M. Hippler in Zusammenarbeit mit E. J. Stauber durchgeführt.

Es stellte sich heraus, dass die Zusammensetzung der Banden noch heterogener war als die Immunoblots es gezeigt hatten. So enthielt die 22,0 kDa-Bande neben Lhca4 auch Spuren von Lhca1. Die Bande bei 22,3 kDa setzte sich, wie schon durch die Immunoblots gezeigt, aus Lhca1 und Lhca4 zusammen. Zudem konnten in ihr zwei Lhca4-Isoformen nachgewiesen werden (siehe auch Kap. D4.1.4.2) und sie enthielt Peptide eines zunächst unbekanntes Proteins, das später als Lhca5-Apoprotein identifiziert werden konnte. Auf dieses neue Lhca-Protein wird in Kap. D4.1.4.1 genauer eingegangen. Die zusätzliche Bande bei 22,7 kDa ist am heterogensten zusammengesetzt. In ihr wurden, wenn die Bande aus der Auftrennung einer PSI-Präparation stammte ^(a), Lhca1, beide Formen des Lhca4, Lhca3 und das „unbekannte“ Protein identifiziert. Stammte die Bande aus einer LHCI-730 Präparation ^(b) fehlte Lhca3, alle anderen oben genannten Proteine waren jedoch enthalten. Die 23,2 kDa Bande enthielt alle Lhca-Proteine, inklusive des neuen Proteins, während in der obersten Bande bei 23,7 kDa, die Peptide für Lhca3 dominierten, aber auch jeweils ein Peptid von Lhca1 und Lhca2 gefunden wurde.

Um zu sehen, ob unterschiedlich prozessierte Formen eines Proteins vorkommen, wurde in den massenspektroskopischen Daten auch nach nur einmal durch Trypsin geschnittenen Peptiden gesucht, die den N-Termini entsprechen könnten. Es wurden jedoch keine N-Termini gefunden.

Tab. 22: Massenspektrometrische Untersuchung der Proteinzusammensetzung der LHCI-Banden. PSI^{a)} bzw. LHCI-730^{b)} wurden in 1-D SDS-Gelen aufgetrennt und die im LHCI-Molekulargewichtsbereich aufgetrennten Banden massenspektrometrisch untersucht. Die Ladung des gemessenen Ions (z), die Abweichung zwischen gemessener und theoretischer Masse des Peptids (ΔM) und der mittels des Sequest Algorithmus errechnete „cross correlation factor“ (X_{corr}) sind aufgeführt.

Bande ¹	Peptide ²	Protein ³	Position ⁴	Referenz ⁵	z	ΔM	X_{corr}	
Lhca4^{a)}	YPGGAFDPLGYSK	Lhca1 (<i>cab6a/6b</i>)	168-180	P12360	2	-1,0	3,81	
	WQDIKNPGSVNQDPIFK	Lhca4 (<i>cab11/12</i>)	157-173	S14305/6	3	0,4	4,66	
	NPGSVNQDPIFK		162-173	S14305/6	2	-0,5	4,13	
	NPGSVNQDPIFK		162-173	S14305/6	1	0	3,06	
	WFIQAEVNGR	Lhca4 (<i>cab11</i>)	90-100	S14305	2	-0,7	4,07	
	WVQAEVNGR	Lhca4 (<i>cab12</i>)	89-99	S14306	2	0,2	2,33	
Lhca1^{a)}	WAMLAVPGIIVPEALGLGNWVK	Lhca1 (<i>cab6a/6b</i>)	94-115	P12360	3	0,4	5,95	
	PSYLDGSAPGDFGFDPLGLGEVPANLER		56-83	P12360	2	0,4	4,96	
	YPGGAFDPLGYSKDKPAKFEELK		168-189	P12360	3	0,4	4,41	
	YPGGAFDPLGYSK		168-180	P12360	2	-0,1	4,3	
	KYPGGAFDPLGYSK		167-180	P12360	3	-0,4	3,59	
	NPGSVNQDPIFK	Lhca4(<i>cab11/12</i>)	162-173	S14305/6	2	0,4	4,15	
	WFIQAEVNGR	Lhca4 (<i>cab11</i>)	90-100	S14305	2	0	3,46	
	WVQAEVNGR	Lhca4 (<i>cab12</i>)	89-99	S14306	2	0	4,5	
	WYVQAEVHAR	Lhca5 (EST)	90-101		2	0,8	3,52	
	WYVQAEVHAR		90-101		3	-0,2	3,45	
	DLPVWYEAGATK		123-134		2	-0,8	3,04	
	neu (*^{a)}	YPGGAFDPLGYSK	Lhca1 (<i>cab6a/6b</i>)	168-180	P12360	2	0,2	4,06
KYPGGAFDPLGYSK			167-180	P12360	2	-0,6	2,95	
WAMLAVPGIIVPEALGLGNWVK			94-115	P12360	2	-0,4	3,51	
WLAYGEVINGR		Lhca3 (<i>cab8</i>)	95-105	P27522	2	0,5	3,43	
GLGGSGDPAYPGGPLFNPLGFGK			191-213	P27522	2	0,6	3,37	
NPGSVNQDPIFK		Lhca4 (<i>cab11/12</i>)	162-173	S14305/6	2	-0,9	3,25	
NPGSVNQDPIFK			162-173	S14305/6	1	0,9	2,37	
WFIQAEVNGR		Lhca4 (<i>cab11</i>)	90-100	S14305	2	0,1	3,98	
WVQAEVNGR		Lhca4 (<i>cab12</i>)	89-99	S14306	2	0,3	4,43	
DLPVWYEAGATK		Lhca5 (EST)	123-134		2	0,5	3,98	
neu (*^{b)}		WAM [#] LAVPGIIVPEALGLGNWVK	Lhca1 (<i>cab6a/6b</i>)	94-115	P12360	3	0,4	4,91
		WAMLAVPGIIVPEALGLGNWVK		94-115	P12360	2	0,2	4,12
		KYPGGAFDPLGYSK		167-180	P12360	3	0,2	3,90
		NPGSVNQDPIFK	Lhca4 (<i>cab11/12</i>)	162-173	S13405/6	2	0,1	3,81
		WQDIKNPGSVNQDPIFK		157-173	S13405/6	3	0,4	4,37
	WYDAGK		126-131	S13405/6	1	0,1	2,03	
	WVQAEVNGR	Lhca4 (<i>cab12</i>)	89-99	S13406	2	0,2	4,14	
	DLPVWYEAGATKFN	Lhca5 (EST)	123-137		2	0,1	3,16	
	Lhca2^{a)}	KYPGGAFDPLGYSK	Lhca1 (<i>cab6a/6b</i>)	167-180	P12360	3	-0,7	3,66
		KYPGGAFDPLGYSK		167-180	P12360	2	0,8	2,76
LTGTDVGYPGGLWFDPLGWGSGSPAK		Lhca2 (<i>cab7</i>)	189-214	P10708	2	-0,1	3,89	
WAMLGAAGIPIPELLTK			113-129	P10708	2	-0,9	3,07	
FAMLGAAGAIPEILGK		Lhca3 (<i>cab8</i>)	106-122	P27522	2	0,9	3,26	
WFIQAEVNGR		Lhca4 (<i>cab11</i>)	90-100	S13405	2	0,7	3,57	
DLPVWYEAGATK		Lhca5 (EST)	123-134		2	-0,4	3,65	
Lhca3^{a)}		YPGGAFDPLGYSK	Lhca1 (<i>cab6a/6b</i>)	168-180	P12360	2	0	4,71
	LTGTDVGYPGGLWFDPLGWGSGSPAK	Lhca2 (<i>cab7</i>)	189-214	P10708	2	0,4	4,07	
	FAMLGAAGAIPEILGK	Lhca3 (<i>cab8</i>)	106-122	P27522	3	-0,8	4,33	
	FAMLGAAGAIPEILGK		106-122	P27522	2	-0,1	2,35	
	GLGGSGDPAYPGGPLFNPLGFGKDEK		191-216	P27522	3	0,5	4,27	
	GLGGSGDPAYPGGPLFNPLGFGK		191-213	P27522	2	0	3,76	
	WLAYGEVINGR		95-105	P27522	2	1,1	3,35	
	SALGLSEGGPLFGFTK	CP22			2	-0,6	4,63	
	FVDDPTPPTGLEK				2	0	3,87	
	FQDWAKPGSMGK				2	-0,2	2,63	

Fortsetzung der Legende zu Tab. 22

- 1) Die Benennung der Banden beruht auf der Immunoblotdetektion in Abb. 21.
 - 2) Peptide, die durch Abgleich der MS-Daten mit theoretischen tryptischen Peptiden von Proteinen in Tomaten-Datenbanken (Kap. B3) identifiziert wurden.
 - 3) Per Massenspektrometrie in den Banden identifizierte Proteine (mit Genbezeichnung in Klammern).
 - 4+5) Position des identifizierten Peptids innerhalb der aus der angegebenen Datenbank-Referenz entnommenen Proteinsequenz. Für Peptide, die in beiden Lhca4-Isoformen enthalten sind, ist keine Position angegeben, da diese in den beiden Isoformen unterschiedlich ist. Die Positionsangabe für Lhca5 bezieht sich auf die in Abb. 23 dargestellte Sequenz.
- # Oxidation von Methionin

Insgesamt lässt sich sagen, dass die heterogene Proteinzusammensetzung der im eindimensionalen Gel aufgetrennten LHCI-Proteinbanden, die sich schon in den Westernblot-experimenten gezeigt hatte, durch die Massenspektrometrie bestätigt wurde. Außerdem wurde das Genprodukt einer bisher nur auf Genebene beschriebenen Lhca4-Isoform (Genprodukt von *cab12*) identifiziert und ein für Tomate noch nicht beschriebenes Lhca-Protein entdeckt. Auf diese beiden Proteine wird im Folgenden näher eingegangen.

4.1.4 Identifikation neuer LHCI-Proteine durch Massenspektrometrie

4.1.4.1 Ein Lhca5-Homolog in Tomate

Wie in Kap. D4.1.3 beschrieben, führte die massenspektrometrische Untersuchung von PSI und LHCI-730 Präparationen aus Tomate zur Detektion von Peptiden, die nicht in den bisher identifizierten Lhca-Proteinen (Lhca1-Lhca4) enthalten sind (Tab. 2).

In einer Tomaten-EST (expressed sequence tag)-Datenbank wurden jedoch mittels BLAST-Suche Klone identifiziert, die für diese Peptide codierende DNA-Sequenzen enthielten. Aus zwei dieser Klone (GenBank Acc.Nr.: AW041324 und AI778223) mit überlappenden Sequenzabschnitten konnte die komplette cDNA eines Gens zusammengesetzt werden, dessen potentiell Genprodukt (Abb. 23) etwa 30 kDa groß ist. Eine BLAST-Suche in der NCBI-Datenbank mit dieser rekonstituierten cDNA-Sequenz als „query“ ergab, dass es sich um das Gen eines *cab*-Proteins handelt. Sowohl die cDNA-Sequenz als auch die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz weisen große Übereinstimmungen mit dem Lhca5 von *A. thaliana* auf. Die Sequenzidentität beträgt dabei 67,8% auf DNA- und 68,8% auf Proteinebene (Abb. 23). Die per Massenspektrometrie gefundenen Peptide stammen also von einem bisher unbekanntem Tomaten-Lhca5-Homolog.

Da Lhc-Proteine kerncodiert sind, besitzen sie eine Transitsequenz, die beim Eintritt in den Chloroplasten abgespaltet wird. Das Protein inklusive Transitsequenz wird als „Precursor“-Protein, das Protein ohne diese Sequenz als „matures“ Protein bezeichnet. Da es sich bei dem aus der cDNA abgeleiteten 30 kDa großen Protein um ein „Precursor“-Protein handelte, wurde ein Computerprogramm (TargetP, www.cbs.dtu.dk/services/targetP) benutzt, um den Beginn des maturen Proteins zu bestimmen. Demnach fängt das mature Lhca5-Protein von Tomate mit der Aminosäureabfolge ARKGHS... an und hat eine theoretische Masse von 24,5 kDa und einen theoretischen pI von 6,79. Für den Lhca5 von *A. thaliana* wurde das Ende der Transitsequenz, d.h. der Beginn des maturen Proteins (AGGG.....) bereits postuliert (Jansson,

1999). Vergleicht man die beiden maturen Proteine miteinander, so steigt die AS-Sequenzidentität auf 77,9% (Abb. 23).

A.th.	-	-	-	-	-	-	M	A	V	V	L	R	G	G	I	T	G	G	F	L	H	H	R	R	D	A	S	S	V	I	T	R	R	I	S	S	V	K	A	
L.es.	M	E	I	A	V	G	R	S	F	Q	V	L	T	L	L	S	G	S	S	F	H	G	K	S	I	R	R	T	C	V	K	G	F	N	S	T	R	A	R	K
A.th.	A	G	G	G	I	N	P	T	V	A	V	E	R	A	T	W	L	P	G	L	N	P	P	P	Y	L	D	G	N	L	A	G	D	Y	G	F	D	P	L	G
L.es.	G	H	S	L	T	P	L	A	Q	A	H	Q	R	P	T	W	L	P	G	L	D	P	P	P	H	L	D	G	T	L	A	G	D	F	G	F	D	P	L	G
A.th.	L	G	E	D	P	E	S	L	K	W	Y	V	Q	A	E	L	V	H	S	R	F	A	M	L	G	V	A	G	I	L	F	T	D	L	L	R	T	T	G	I
L.es.	L	G	E	D	P	E	S	L	K	W	Y	V	Q	A	E	L	V	H	A	R	F	A	M	A	G	V	A	G	I	L	L	T	D	L	L	R	V	T	R	I
A.th.	R	N	L	P	V	W	Y	E	A	G	A	V	K	F	D	F	A	S	T	K	T	L	I	V	V	O	F	L	L	M	G	F	A	E	T	K	R	Y	M	D
L.es.	R	D	L	P	V	W	Y	E	A	G	A	T	K	F	N	F	A	S	T	T	T	L	L	I	I	O	L	L	L	M	G	F	V	F	T	K	R	Y	M	D
A.th.	F	V	S	P	G	S	Q	A	K	E	G	S	F	F	F	G	L	E	A	A	L	E	G	L	E	P	G	Y	P	G	G	P	L	L	N	P	L	G	L	A
L.es.	F	L	H	P	G	S	Q	A	K	P	G	S	F	F	-	G	L	E	A	A	L	E	G	L	E	P	G	Y	P	G	G	P	L	L	N	P	L	G	I	G
A.th.	K	D	V	Q	N	A	H	D	W	K	L	K	E	I	K	N	G	R	L	A	M	M	A	M	L	G	F	F	V	Q	A	S	V	T	H	T	G	P	I	D
L.es.	K	D	I	K	N	A	K	D	W	K	L	K	E	I	K	N	G	R	L	A	M	V	A	M	L	G	I	F	V	Q	A	S	V	T	H	V	G	P	I	D
A.th.	N	L	V	E	H	L	S	N	P	W	H	K	T	I	I	Q	T	L	F	T	S	T	S																	
L.es.	N	L	I	D	H	L	S	N	P	W	H	K	T	I	L	Q	T	I	A	A	S	S	S																	

Abb. 23: Alignment der Aminosäure-Sequenz des aus EST-Sequenzen rekonstruierten Lhca5-Homologs von Tomate (*L. es.*) mit der bekannten Lhca5-Sequenz von *Arabidopsis thaliana* (*A. th.*). Die per Massenspektrometrie detektierten Peptide sind blau, der Beginn der maturen Proteine (nach Jansson, 1999 bzw. TargetP, siehe Text) ist rot, und die potentiell chlorophyllbindenden Aminosäuren sind grün markiert.

Vergleicht man die Sequenz des maturen Tomaten-Lhca5 mit der der anderen Lhca-Proteine aus Tomate, so ergibt sich die größte Sequenzidentität mit Lhca4 (47%) und Lhca2 (46%). Weniger Übereinstimmung wird mit Lhca3 und Lhca1 gefunden (43,4% bzw. 33,5%).

4.1.4.2 Cab12 – eine zweite Isoform des Lhca4

Wie oben ebenfalls bereits erwähnt, wurde bei den massenspektrometrischen Untersuchungen auch ein Peptid entdeckt, das eindeutig die cab12-Isoform des Lhca4 identifiziert.

Im oberen Teil der Abb. 24 ist das Massenspektrum dieses Peptids mit der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz zu sehen. Um zu zeigen, dass es sich um ein Peptid handelt, das nur aus der cab12-Isoform stammen kann, ist als Vergleich das Spektrum der entsprechenden Proteinsequenz von cab11 angeführt. Die beiden Lhca4-Isoformen unterscheiden sich an AS-Position 87 bzw. 88 des entsprechenden Proteins durch den Austausch eines Isoleucins gegen ein Valin. Dieser Austausch genügt, um die entsprechenden Peptidsequenzen massenspektrometrisch unterscheiden zu können.

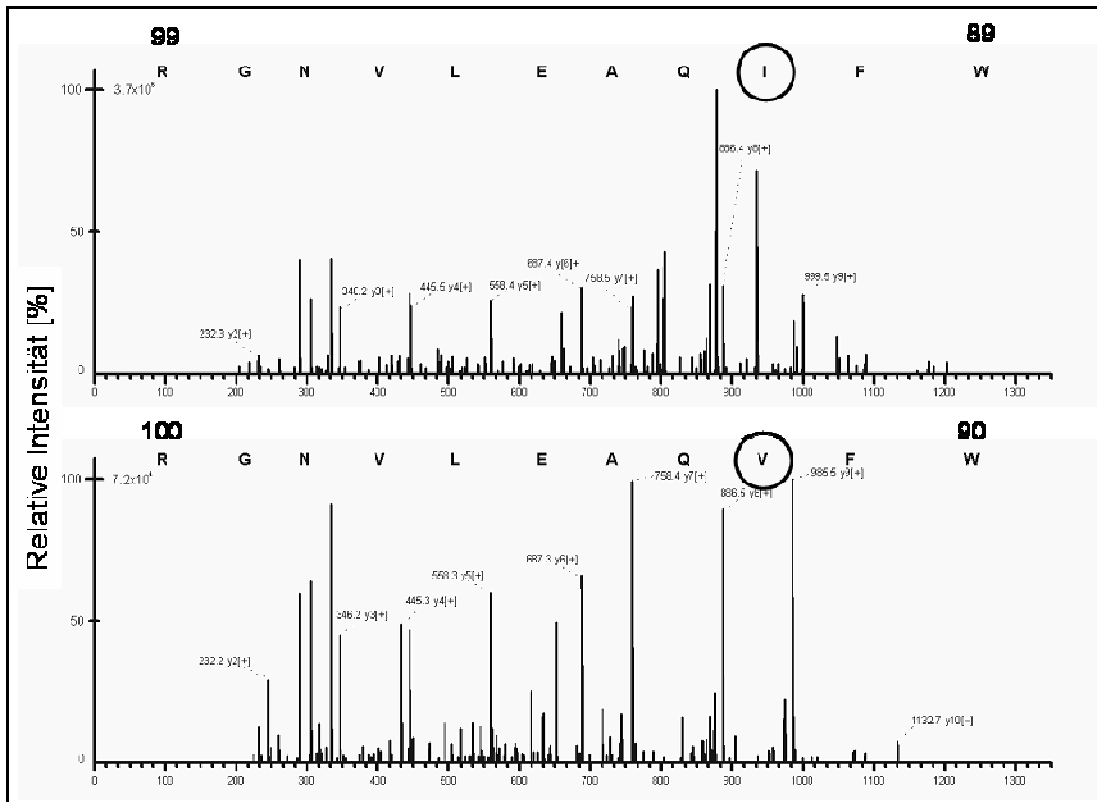


Abb. 24: Massenspektrometrische Unterscheidung der *cab11*- und *cab12*-Genprodukte. Gezeigt sind die MS/MS-Spektren und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenzen der Peptide, die eine eindeutige Identifizierung von *cab11* (unten) bzw. *cab12* (oben) erlauben.

Mit Hilfe von massenspektrometrischen Untersuchungen ist es also gelungen, neben der zweiten Isoform des Lhca4 (*cab12*), ein weiteres Lhca-Protein (Lhca5) in einer höheren Pflanze nachzuweisen.

4.2 Auftrennung von LHCI-Proteinen aus Tomate per zweidimensionaler Gelelektrophorese

Nachdem sich bei der Analyse der in eindimensionalen Gelen aufgetrennten LHCI-Proteinbanden gezeigt hatte, dass alle untersuchten Banden mehrere Apoproteine enthielten, stellte sich die Frage woraus diese Heterogenität resultiert. Zum einen könnte es bedeuten, dass ein Protein in Varianten mit unterschiedlichen Molekulargewichten vorkommt, die z.B. durch Prozessierung zustande kommen könnten, oder dass das Protein posttranslationale Modifikationen trägt, die sein elektrophoretisches Verhalten beeinflussen. Um der Ursache dieser Heterogenität auf den Grund zu gehen, wurde PSI mittels eines 2D-Gelsystems aufgetrennt (Kap. C3.5) und die resultierenden Proteinspots per Immunoblotting (Kap. C3.6.2) und Massenspektrometrie (Kap. C3.6.3) untersucht.

4.2.1 Identifizierung der durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennten LHCI-Proteine

Zur zweidimensionalen Proteinauftrennung wurde zunächst eine isoelektrische Fokussierung (IEF) in PAA-Gelen mit einem immobilisierten pH-Gradienten durchgeführt (Kap. C3.5.2.2), durch die die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) aufgetrennt wurden. Da die Lhca-Proteine alle einen relativ ähnlichen pI besitzen (zwischen pH 5 und pH 6 Tab. 2), wurden für die erste Dimension Gele mit einem linearen pH-Gradienten von 4-7 verwendet, um eine möglichst gute Auftrennung zu erreichen. Im Anschluß an die IEF wurden die Proteine mittels SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

In Abb. 25 ist das typische Auftrennungsmuster nach Färbung der Proteine mit Silber gezeigt. Die im hochmolekularen Bereich liegenden Spots entsprechen wahrscheinlich PSI-Kernuntereinheiten. Der Kasten zeigt in Vergrößerung den Molekulargewichtsbereich der LHCI-Proteine. Es fällt auf, dass Reihen aus mehreren Proteinspots mit gleichem Molekulargewicht, aber unterschiedlichem pI aufgelöst wurden. Außerdem sind mehr Spotreihen vorhanden als aufgrund der Anzahl der bisher beschriebenen Lhca-Proteine (vier) zu erwarten gewesen wären (sechs bis sieben). Die Zuordnung der Spot-Reihen zu den Lhca-Apoproteinen erfolgte aufgrund des Molekulargewichts der Lhca-Proteine und deren Laufverhalten in 1D-Gelen (Abb. 21).

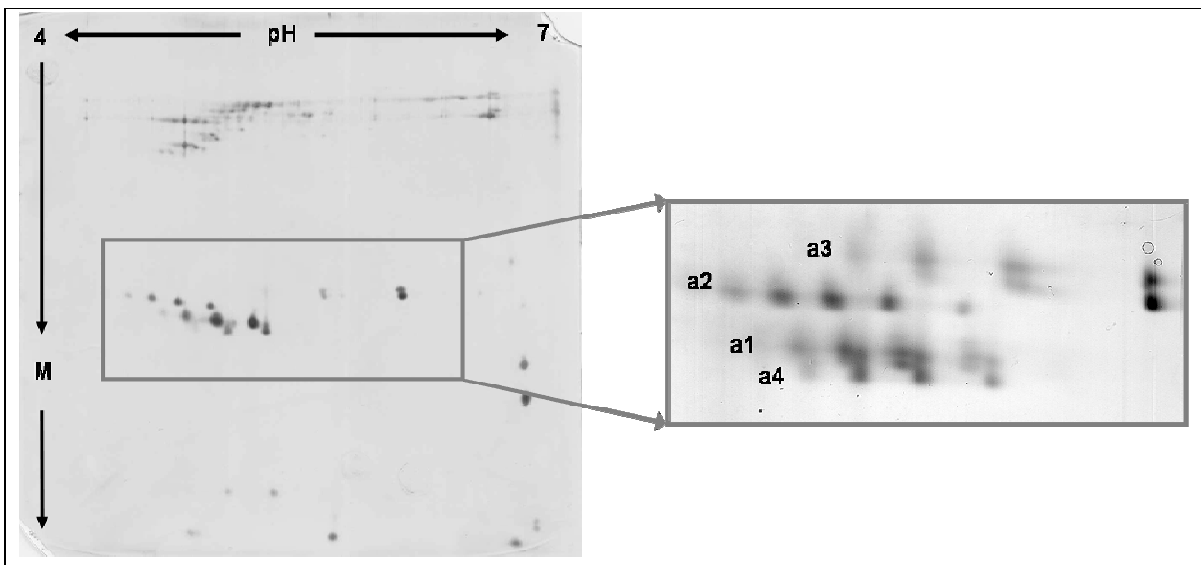


Abb. 25: 2D-Gelelektrophorese von PSI aus Tomate. Denaturierte PSI-Proteine wurden in der ersten Dimension mittels isoelektrischer Fokussierung in PAA-Gelen mit einem pH-Gradienten von 4-7 nach ihrem isoelektrischen Punkt und im Anschluß in der zweiten Dimension mittels SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht (M) aufgetrennt. Der Kasten stellt eine Vergrößerung des LHCI-Bereiches dar. Die Zuordnung der Spotreihen zu den Lhca-Apoproteinen (a1-a4, Lhca1-Lhca4) erfolgte auf Grundlage des Laufverhaltens in eindimensionalen Gelen (Abb. 21).

Um die Zuordnung der Spotreihen zu den Lhca-Apoproteinen zu bestätigen, wurden mit den per 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten PSI-Proteinen Immunoblotexperimente mit apoprotein-spezifischen AK durchgeführt.

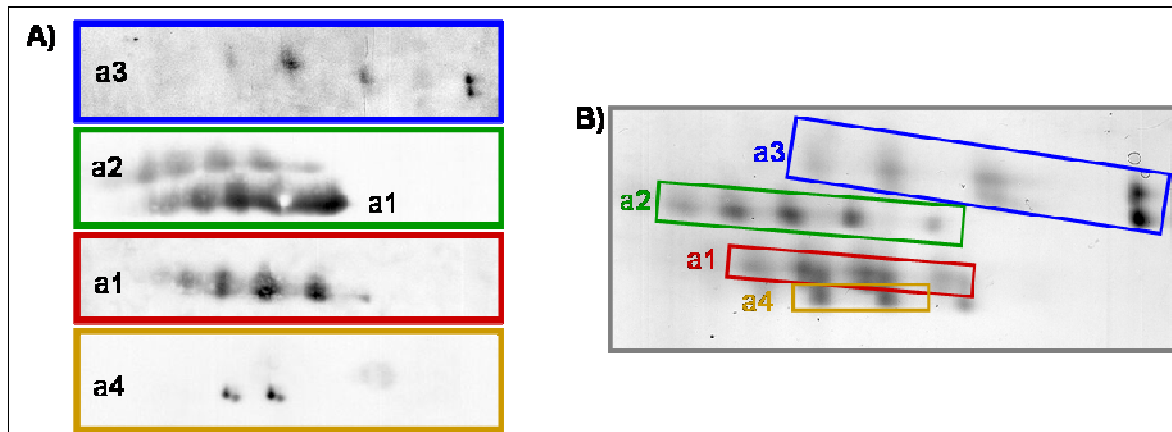


Abb. 26: Antikörperdetektion der per 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten Lhca-Proteine. Per zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennte LHCI-Proteine wurden mit Antikörpern dekoriert, die spezifisch für Lhca1-4 sind, und über das „enhanced chemoluminescence“ System detektiert. In Abb. A) sind die Ergebnisse für jeden Antikörper einzeln aufgeführt, während in Abb. B) diese Ergebnisse auf ein silbergefärbtes Gel übertragen wurden. a1-a4, Lhca1-Lhca4.

In Abb. 26A sind die Ergebnisse für jeden Antikörper einzeln dargestellt, während in Abb. 26B die Lage der entsprechenden Spots im silbergefärbten Gel zu sehen ist. Der anti-Lhca3-AK (a3) detektiert die zwei obersten Spotreihen mit unterschiedlichem Molekulargewicht, die die höchsten pI aufweisen und aus jeweils drei bis vier Spots mit einem pI zwischen 5,1 und 6,0 bestehen. Die Spotreihe mit den sauersten pI (4,8 bis 5,5), bestehend aus vier bis fünf Spots, wird von dem anti-Lhca2-AK erkannt. Dieser Blot wurde im Anschluß an die Lhca2-Detektion nochmals mit anti-Lhca1-AK inkubiert, um die Lagebeziehung der Proteinspots zu erfassen. Wie zu sehen ist, reagiert der anti-Lhca1-AK mit den beiden direkt unter der Lhca2-Reihe liegenden Spotreihen, die aus vier Spots mit pI zwischen 4,9 und 5,6 bestehen. Der anti-Lhca4-AK detektiert vier Spots im unteren Molekulargewichts- und mittleren pI-Bereich (5,1 bis 5,3) des LHCI-Bereiches, wobei die Zuordnung zu den silbergefärbten Spots nicht eindeutig ist, da die Auftrennung zwischen Lhca1 und Lhca4 aufgrund ihres ähnlichen Molekulargewichts und pI (Tab. 2) nicht optimal ist. In Tab. 23 ist für jede Lhca-Proteinreihe der pI der verschiedenen Spots aufgeführt.

Tab. 23: Isoelektrische Punkte der verschiedenen Spots der Lhca-Proteine. Für jedes Protein sind die am stärksten gefärbten Spots fett markiert. Die Buchstaben in Klammern entsprechen den Spotbezeichnungen in Abb. 28.

Protein	Reihen	1	2	3	4	5
Lhca1	2	4,92	5,09 (G)	5,27 (H+K)	5,49	--
Lhca2	1	4,76 (C)	4,88 (D)	5,05 (E)	5,19 (F)	5,46
Lhca3	2	5,11	5,34	5,63	6,02 (A+B)	--
Lhca4	2	5,09 (G)	5,12 (J)	5,27 (K)	5,34 (I+L)	

4.2.2 Untersuchung des Phosphorylierungszustandes von PSI-Untereinheiten

Laufunterschiede im SDS-Gel können unter anderem durch die Phosphorylierung eines Proteins hervorgerufen werden. Außerdem verändert das Anhängen von Phosphatgruppen den pI eines Proteins. Um zu überprüfen, ob Phosphorylierungen eine Erklärung für das Auftreten von dem selben Lhca-Apoprotein in unterschiedlichen Banden einer eindimensionalen SDS-PAGE bzw. für das Auftreten von Proteinspots mit unterschiedlichem pI in der 2D-Gel-elektrophorese sein könnten, wurde der Phosphorylierungsgrad von Proteinen des PSI untersucht. Dazu wurden zunächst Thylakoide und PSI mittels einer SDS-PAGE (Minigel, C3.5.1.1) aufgetrennt und im Anschluß daran direkt im Gel ein Phosphoproteinnachweis (Kap. C3.6.1.3) durchgeführt. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie gefärbt (Abb. 27), so dass die positiven Reaktionen direkt bestimmten Proteinbanden zugeordnet werden konnten.

Positive Reaktionen zeigten das Markerprotein Ovalbumin (zweifach phosphoryliert) und mehrere Proteine der Thylakoidpräparation (T), bei denen es sich aufgrund ihres Laufverhaltens um die PSII-Proteine CP47, D1 und D2 handeln dürfte. Die am stärksten phosphorylierte Bande bei 26-27 kDa entspricht sehr wahrscheinlich dem Lhcb1-Protein, von dem ebenfalls bekannt ist, dass es phosphoryliert werden kann. In der PSI-Präparation (P) ist lediglich eine Reaktion bei 66 kDa zu erkennen, jedoch nicht im Bereich der Lhca-Proteine zwischen 20 und 25 kDa.

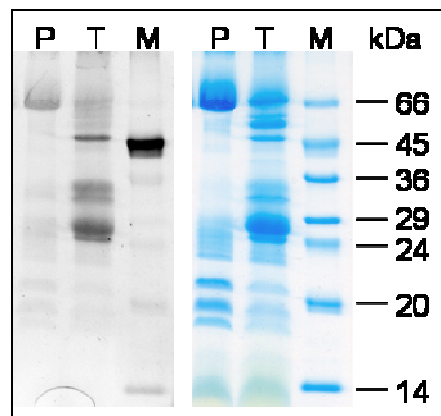


Abb. 27: Untersuchung der Phosphorylierung von PSI-Proteinen. Links ist die Fluoreszenzaufnahme einer mit dem Phosphoprotein-Detektions-Kit angefärbten SDS-PAGE zu sehen. Rechts ist das gleiche Gel nach anschließender Färbung mit Coomassie dargestellt. P, PSI; T, Thylakoide; M, Molekularmassenstandard.

4.2.3 Massenspektrometrische Untersuchung der Proteinzusammensetzung der per 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten LHCI-Proteinspots

Nachdem die Phosphoproteinuntersuchung kein Ergebnis lieferte, durch das die in der 2D-Gel-elektrophorese auftretende Spotvielfalt zu erklären wäre, wurden einige Proteinspots ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht (Kap. C3.6.3.1). Dabei wurde nach Proteinmodifikationen wie z.B. Phosphorylierungen, Acetylierungen, Carbamylierungen, und Carbamidomethylierung, und nach Peptiden mit nur einer tryptischen Schnittstelle (N-Terminus oder C-Terminus) gesucht.

In Tab. 24 ist die AS-Sequenz der in den verschiedenen Spots detektierten Peptide und die Position, die diese in den murenen Proteinen einnehmen zusammengestellt. Außerdem ist für jedes Protein die entsprechende Datenbankreferenz angegeben. Die Benennung der Spots in

Tab. 24 bezieht sich auf Abb. 28, in der die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen und der Immunodekoration zusammengefasst sind.

Tab. 24: Massenspektrometrische Untersuchung der Proteinzusammensetzung der durch 2-D Gelelektrophorese aufgetrennten Lhca-Spots. Die Spots wurden aus den Gelen ausgeschnitten, proteolytisch verdaut und per Massenspektrometrie analysiert. Die Ladung des gemessenen Ions (z), die Abweichung zwischen gemessener und theoretischer Masse des Peptids (ΔM) und der mittels des Sequest Algorithmus errechnete „cross correlation factor“ (X_{corr}) sind aufgeführt.

2-D Spot ¹⁾	Peptide ²⁾	Protein ³⁾	Position ⁴⁾	Referenz ⁵⁾	z	ΔM	X_{corr}
A	WLAYGEVINGR	Lhca3 (<i>cab8</i>)	95-105	P27522	2	-0,5	2,94
	FAMLGAAGAIPEILGK		106-122	P27522	2	-0,9	2,67
B	GLGGSGDPAYPGGPLFNPL	Lhca3 (<i>cab8</i>)	191-213	P27522	2	1,3	4,21
	GFGK		95-105	P27522	2	0,9	3,7
	WLAYGEVINGR		106-122	P27522	2	1,3	2,98
	FAMLGAAGAIPEILGK		171-182	P27522	2	0,9	3,25
C	PGC [#] VNTDPIFPNNK	Lhca2 (<i>cab7</i>)	175-188	P10708	2	0,1	2,52
	PGC [#] VNTDPIFPNNK	Lhca2 (<i>cab7</i>)	175-188	P10708	2	-1,2	2,62
D	KYPGGAFDPLGYSK	Lhca1 (<i>cab6a/6b</i>)	167-180	P12360	2	-0,4	2,49
	YKESELIHC [#] R		84-93	P12360	2	-0,2	2,35
	NPGSVNQDPIFK	Lhca4 (<i>cab11/12</i>)		S14305/6	2	0,4	2,85
E	YPGGAFDPLGYSK	Lhca1 (<i>cab6a/6b</i>)	168-180	P12360	2	0,9	4,63
	KYPGGAFDPLGYSK		167-180	P12360	2	1,1	3,93
	WADIIKPGC [#] VNTDPIFPNNK	Lhca2 (<i>cab7</i>)	169-188	P10708	3	2,2	5,05
	WAM [*] LGAAGIFPELLTK		113-129	P10708	2	1,3	4,2
	W [§] AMLGAAGIFPELLTK		113-129	P10708	2	1,3	4,19
F	NPGSVNQDPIFK	Lhca4 (<i>cab11/12</i>)		S14305/6	2	0,8	3,68
	KYPGGAFDPLGYSK	Lhca1 (<i>cab6a/6b</i>)	167-180	P12360	2	0,0	3,2
	YPGGAFDPLGYSK		168-180	P12360	2	-1,2	3,06
G	NPGSVNQDPIFK	Lhca4 (<i>cab11/12</i>)		S14305/6	2	-1,2	3,4
	NPGSVNQDPIFK	Lhca4 (<i>cab11/12</i>)		S14305/6	2	-0,9	3,61
H	YPGGAFDPLGYSK	Lhca1 (<i>cab6a/6b</i>)	168-180	P12360	2	-0,5	3,74
	KYPGGAFDPLGYSK		167-180	P12360	3	1,2	4,2
	NPGSVNQDPIFK	Lhca4 (<i>cab11/12</i>)		S14305/6	2	0,7	3,69
	WQDIKNPGSVNQDPIFK		157-173	S14305/6	3	1,2	3,83
	WVQAELVNGR	Lhca4 (<i>cab12</i>)	89-99	S14306	2	0	3,94
I	NPGSVNQDPIFK	Lhca4 (<i>cab11/12</i>)		S14305/6	2	0	2,79
J	NPGSVNQDPIFK	Lhca4 (<i>cab11/12</i>)		S14305/6	2	0,2	3,98
	WVQAELVNGR	Lhca4 (<i>cab12</i>)	89-99	S14306	2	0,1	3,69
K	YPGGAFDPLGYSK	Lhca1 (<i>cab6a/b</i>)	168-180	P12360	2	0,1	2,68
	NPGSVNQDPIFK	Lhca4 (<i>cab11/12</i>)		S14305/6	2	0,3	3,81
	WQDIKNPGSVNQDPIFK			S14305/6	3	1,2	4,8
	WVQAELVNGR	Lhca4 (<i>cab12</i>)	89-99	S14306	2	0,8	3,98
L	NPGSVNQDPIFK	Lhca4 (<i>cab11/12</i>)		S14305/6	2	0,8	4,03
	WQDIKNPGSVNQDPIFK			S14305/6	3	1,2	5,37
	C [#] GYPGGIFNPLNFAPTTEAK	Lhca4 (<i>cab11</i>)	182-201	S14305	2	0,9	4,55
M	NPGSVNQDPIFK	Lhca4 (<i>cab11/12</i>)	162-173	S14305/6	2	0,8	3,74
	WQDIKNPGSVNQDPIFK		157-173	S14305/6	3	1,4	3,6
	C [#] GYPGGIFNPLNFAPTTEAK	Lhca4 (<i>cab11</i>)	182-201	S14305	2	1,4	4,9
	WFIQAELVNGR		90-100	S14305	2	0,8	4,7

1) Die Benennung der Spots entspricht der in Abb. 28.

2) Peptide, die durch Abgleich der MS-Daten mit theoretischen tryptischen Peptiden von Proteinen in Tomaten-Datenbanken (siehe Kap. C3.6.3.1) identifiziert wurden.

3) Per Massenspektrometrie in den 2D-Spots identifizierte Proteine (mit Genbezeichnung in Klammern).

4+5) Position des identifizierten Peptids innerhalb der aus der genannten Datenbank-Referenz entnommenen Proteinsequenz. Für Peptide, die in beiden Lhca4-Isoformen enthalten sind, ist keine Position angegeben, da diese in den beiden Isoformen unterschiedlich ist.

[#] Carbamidomethylierung von Cystein

^{*} Oxidation von Methionin

[§] Keto-, Amino- oder Hydroxy-Modifikation von Tryptophan

Wie aus Tab. 24 abzulesen ist, enthält ein Großteil der 2D-Spots weniger Proteine als die im 1D-Gel aufgelösten Banden (Tab. 22). Lediglich in den Spots D und E konnten drei unterschiedliche Proteine identifiziert werden, ansonsten enthielten die Spots entweder zwei (Spots F, H, K) oder nur ein Protein (Spots A, B, C, G, I, J, L, M).

Bei einigen der detektierten Peptide wurden artifizielle Modifikationen einzelner Aminosäuren entdeckt, z.B. Carbamidomethylierung von Cystein ([#], Spots C, D, E, L, M), Oxidation von Methionin (^{*}, Spot E) oder eine Keto-, Amino- oder Hydroxy-Modifikation von Tryptophan ([§], Spot E). Durch diese läßt sich das unterschiedliche elektrophoretische Verhalten bzw. das Auftreten von Proteinformen mit unterschiedlichem pI jedoch nicht erklären. Andere Proteinmodifikationen und N- bzw. C-Termini wurden nicht entdeckt. Auch Proteinphosphorylierungen konnten durch die Massenspektrometrie nicht nachgewiesen werden, was mit den Ergebnissen der Phosphoproteindetektion (Kap. D4.2.2) übereinstimmt.

4.2.4 2D-Karte des LHCI – Zusammenfassung der Ergebnisse aus Immunodetektion und Massenspektrometrie

In Abb. 28 sind die Ergebnisse der Untersuchung der Proteinzusammensetzung der 2D-Spots mittels Immunodekoration und Massenspektrometrie zusammengefasst.

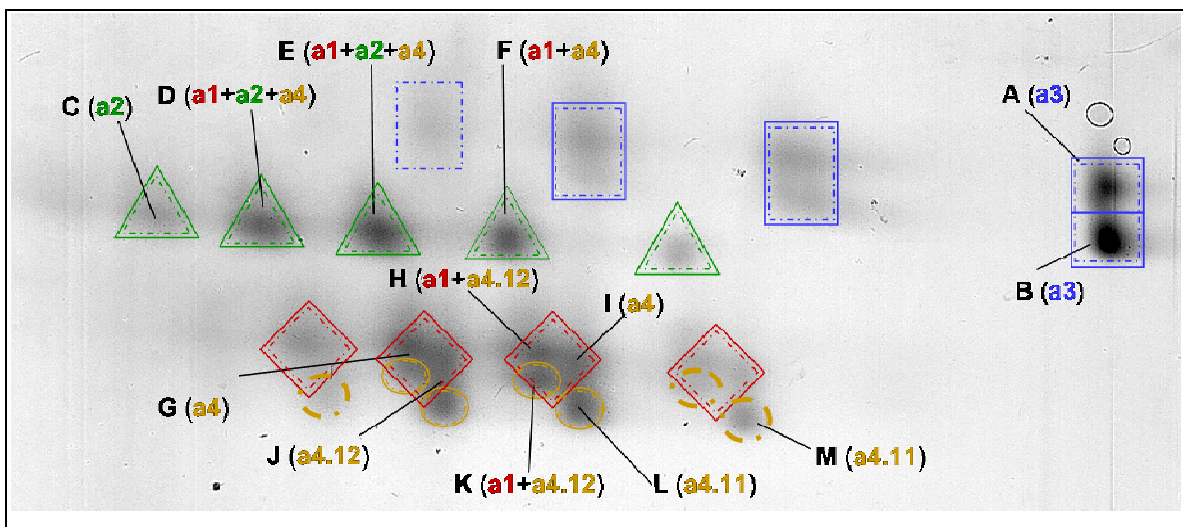


Abb. 28: 2D-Karte der LHCI-Proteine von Tomate. In der Abbildung sind die Ergebnisse der Proteinidentifizierung per Immunoblots und Massenspektrometrie zusammengefasst. Die Zuordnung der Lhca-Proteine erfolgte aufgrund a) ihrer Molekularmasse (gestrichelte Linien), b) der Immunoblots in Abb. 26 (durchgehende Linien) oder c) der Ergebnisse der Massenspektroskopie in Tab. 24 (Buchstaben). Lhca3, Rechtecke/blau; Lhca2, Dreiecke/grün; Lhca1, Quadrate/rot; Lhca4, Kreise/gelb; a4.11, Genprodukt von *cab11*; a4.12, Genprodukt von *cab12*.

In den beiden durch den Lhca3-AK erkannten Spots (A+B) mit einem pI von 6,02 und unterschiedlichem Molekulargewicht wurden wie erwartet nur Peptide des Lhca3 gefunden. Genauso wurde in Spot C, in Übereinstimmung zu den Immunoblottergebnissen, lediglich ein Peptid des Lhca2 nachgewiesen. Allerdings konnte dieses Peptid genauso wie die Lhca2-Peptide in den Spots D+E, die ebenfalls eindeutig durch den anti-Lhca2-AK erkannt wurden, erst nachgewiesen werden, nachdem die auf das Gel aufgetragene Proteinmenge und die zum

Verdau eingesetzte Trypsinkonzentration erhöht wurden (siehe Kap. C3.5.2.1 und Kap. C3.6.3.1).

Im Gegensatz zu den Spots A-C enthalten alle weiteren untersuchten Spots mehrere Lhca-Proteine, davon immer mindestens eine der Isoformen von Lhca4. Allerdings kommen in keinem Spot die für *cab11* und *cab12* spezifischen Peptide (Kap. D4.1.4.2) gemeinsam vor. In den Spots mit niedrigerem *pI* (Spots H, J, K; *pI* 5,12 + 5,27) ist das *cab12*-Genprodukt enthalten, während das für das *cab11*-Genprodukt charakteristische Peptid in den Spots mit höherem *pI* vorkommt (Spots L, M; *pI* 5,34 + 5,56). Peptide, die keine Unterscheidung zwischen den Lhca4-Isoformen zulassen, wurden in mehreren Spots entdeckt (Spots D-G, I). Manche der Spots, in denen Lhca4-Peptide gefunden wurden, reagierten jedoch eindeutig nicht mit dem Lhca4-AK (Spots D-F, I, M).

Das Lhca1-Apoprotein wurde in Übereinstimmung mit den Westernblotergebnissen in den Spots H und K gefunden, allerdings wurde es auch in den Spots D-F nach-gewiesen, obwohl diese nicht mit dem entsprechenden Antikörper reagierten. Im Gegensatz dazu konnten in einigen Spots, die eindeutig mit einem AK reagierten, die entsprechenden Proteine nicht identifiziert werden, z.B. wurde in Spot F kein Lhca2-Peptid und in Spot G kein Lhca1-Peptid gefunden.

4.3 Massenspektrometrische Größenbestimmung von LHCI-Proteinen

Da die bisher beschriebenen massenspektrometrischen Untersuchungen mit tryptisch verdauten Proteinproben durchgeführt wurden, lässt sich über die Molekulargewichte der in den PSI-Proben enthaltenen Proteine nichts aussagen. Deshalb wurden in Zusammenarbeit mit H. Toll (AG Huber, Institut für Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Universität des Saarlandes, Saarbrücken) MS-Messungen von LHCI-730 und LHCI-680 Präparationen ohne vorherigen Verdau durchgeführt (Kap. C3.6.3.2). Dabei wurden Proteine mit den in Tab. 25 zusammengestellten Molekularmassen detektiert.

Die meisten gemessenen Molekularmassen konnten durch Vergleich mit theoretisch ermittelten Molekularmassen den bereits bekannten Lhca-Proteinen (Lhca1-4) zugeordnet werden. Für die fettgedruckten Molekularmassen war dies jedoch nicht der Fall. Da diese Proteine jedoch im Molekulargewichtsbereich der LHC-Proteine liegen, könnte es sich dabei um das neu entdeckte Lhca5-Protein (Kap. D4.1.4.1) handeln.

Die schrittweise Verkürzung des von TargetP vorhergesagten Tomaten-Lhca5-Proteins (Abb. 23, Kap. D4.1.4.1) ergab, dass die Deletion von weiteren 19 AS am N-Terminus dieses Proteins ein Protein mit einer Masse von 22325,92 Da ergeben würde. Dieser Wert stimmt sehr gut mit einer der gemessenen Molekularmassen (22325,8 Da) überein. Dies würde bedeuten, dass das mature Lhca5-Proteins von Tomate mit der AS-Abfolge LPGLDP..... beginnt.

Tab. 25: Durch Massenspektrometrie in LHCI-730- und LHCI-680-Präparationen aus Tomate bestimmte Molekulargewichte und die damit korrespondierenden Proteine. Die Proteinsequenz wurde unter der angegebenen Referenz der NCBI-Datenbank entnommen.

Protein (Gen)	Referenz	Molekulargewicht (theoretisch)	Molekulargewicht (gemessen)
LHCI-730			
Lhca1 (<i>cab6b</i>)	P12360	21851,1	21896,7
Lhca1 (<i>cab6a</i>)	S00443	21879,1	21880,5
Lhca4 (<i>cab12</i>)	S14306	22286,4	22287,8
Lhca4 (<i>cab11</i>)	S14306	22308,4	22309,8
Lhca5 ab LPGLDP	Abb. 23	22325,9	22325,8
?	--	--	22593,0
?	--	--	22601,3
LHCI-680			
Lhca1 (<i>cab6b</i>)	S00443	21879,1	21881,8
Lhca2 (<i>cab6a</i>)	P10708	23178,5	23179,0
Lhca2?	--	--	23222,1
Lhca3 (<i>cab8</i>)	P27522	25043,7	25074,2
Lhca4 (<i>cab11</i>)	S14305	22308,4	22309,9
CP29	ESTs	28514,6	28489,1

5. Charakterisierung eines neuen LHCI-Proteins (Lhca5)

Eine cDNA-Sequenz, die für ein potentielles zusätzliches Lhc-Protein des PSI in *A. thaliana* codiert wurde bereits 1999 von Jansson beschrieben und als *lhca5* bezeichnet. Allerdings konnte das entsprechende Protein nicht nachgewiesen werden, was möglicherweise an dem unter den Anzuchtbedingungen niedrigen Expressionslevel von *lhca5* lag. Nachdem mit der oben beschriebenen Methode nun ein Lhca5-Homolog in Tomate auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte (Kap. D4.1.4.1), stellte sich die Frage, ob es sich bei Lhca5 tatsächlich um ein Lichtsammelprotein des PSI handelt, d.h. ob es in der Lage ist Pigmente zu binden und in einer funktionellen Weise anzuordnen. Die Isolation eines nativen Lhca5-Pigment-Protein-Komplex ist bis jetzt noch nicht gelungen. Um dennoch etwas über die Funktionalität von Lhca5 aussagen zu können, wurden rekombinantes Lhca5-Apoprotein und aus Thalykoiden isolierte Pigmente benutzt, um daraus *in vitro* mit Hilfe der Detergenswechsellmethode (Kap. C2.4) einen LHC zu rekonstituieren. Dieser r-LHC wurde dann biochemisch und hinsichtlich seiner Fluoreszenzeigenschaften untersucht.

5.1 Überexpression rekombinanter Lhca5-Apoproteine

Um Rekonstitutionsexperiment durchführen zu können, musste das Lhca5-Apoprotein zunächst rekombinant in *E.coli* hergestellt werden (Kap. C2.3). Dazu wurde die codierende Sequenz wie in Kap. B4 beschrieben in ein Expressionsplasmid einkloniert.

Der Beginn des muren Lhca5-Proteins ist noch Gegenstand von Diskussionen, da es bisher noch nicht isoliert und sequenziert werden konnte. Für den Lhca5 von *A. thaliana* wurde wie

bereits erwähnt von Jansson (1999) ein N-Terminus postuliert. Dieser stimmt im Wesentlichen mit dem durch das Programm TargetP bestimmten Beginn des muren Tomaten-Proteins überein (siehe Abb. 23 und Tab. 26). Deshalb wurde zunächst Versuche zur Überexpression von vier Lhca5-Apoproteinvarianten, die dem Vorläuferprotein und dem muren Protein von *A. thaliana* und Tomate entsprechen sollten, unternommen.

5.1.1 Tomaten-Proteine

In Tab. 26 sind alle konstruierten Tomaten-Lhca5-Klone aufgeführt, die zur Überexpression eingesetzt wurden.

Tab. 26: Zusammenstellung der Varianten des Lhca5 von Tomate (*Lycopersicon esculentum*), deren Überexpression versucht wurde. Die Tabelle enthält den Namen des zur Überexpression verwendeten Klons und die N-terminale Sequenz mit Angabe der Quelle, auf die sich der N-Terminus bezieht. Außerdem ist vermerkt, ob die Sequenz das amber-Stoppocodon enthielt, und ob die DNA-Sequenzierung (S) positiv ausfiel, bzw. ob Überexpression (Ü) und Rekonstitution (R) erfolgreich durchgeführt werden konnten.

Name	N-Terminus nach	N-terminale Sequenz	amber-stop	S	Ü	R
<i>precursor</i>						
37.1	Jansson (1999)	MEIAVGRSFQVLTLGSSSFHGKSIIRTCVKGFNSTR ARKGHSLTPLAQAHQRPTWLPGLDPP.....	nein	ja	ja	ja
<i>matur</i>						
40.1	Jansson (1999)	ARKGHSLTPLAQAHQRPTWLPGLDPP.....	nein	ja	nein	-
1.4	Ganeteg et al. (2004)	AHQRPTWLPGLDPP.....	nein	ja	nein	-
2.4	Ganeteg et al. (2004) minus 4AS	PTWLPGLDPP.....	nein	ja	nein	-
3.4	Ganeteg et al. (2004) minus 7AS	LPGLDPP.....	nein	nein	-	-
4.4	Jansson (1999) AS 1-4 von A. th.	AGGGHSLTPLAQAHQRPTWLPGLDPP.....	nein	ja	nein	

Im Falle der Tomaten-Lhca5-Proteine gelang lediglich die Überexpression des Vorläuferproteins (Klon 37.1) (Abb. 29). Mittels Immunodekoration mit einem anti-Lhca5-AK (Eurogentec, Liege, Belgien) ließ sich das überexprimierte Protein eindeutig nachweisen (Abb. 29)

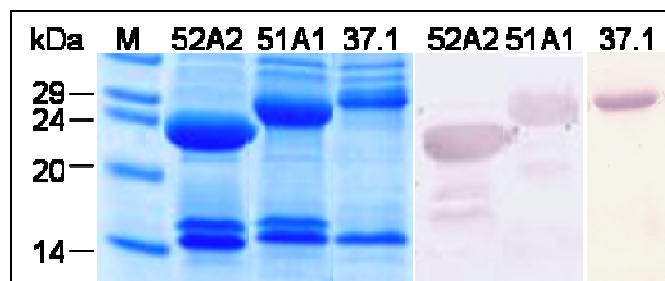


Abb. 29: Identifikation von in *E.coli* überexprimierten Lhca5-Apoproteinen. Zu sehen ist ein mit Coomassie angefärbtes denaturierendes Polyacrylamidgel mit IB-Präparationen verschiedener Lhca5-Klone und die dazu gehörenden, mit Lhca5-Antikörpern inkubierten Immunoblots. 52A2, murer Lhca5 von *A. thaliana*; 51A1, Vorläuferprotein des Lhca5 von *A. thaliana*, 37.1, Vorläuferprotein des Lhca5 von Tomate.

Das mature Lhca5-Protein von Tomate mit dem durch TargetP postulierten N-Terminus (Klon 40.1) liess sich nicht überexprimieren. Deshalb wurden verschiedene Klone mit veränderten N-Termini hergestellt. Zum einen wurde versucht eine Proteinvariante zu überexprimieren, deren erste vier AS denen des murenen Lhca5 von *A. thaliana* entsprachen (Klon 4.4). Zum anderen sollten Proteine mit verkürzten N-Termini hergestellt werden. Dabei sollte der N-Terminus einmal dem in Ganeteg et al. (2004) für den Lhca5 von *A. thaliana* postulierten Beginn entsprechen (Klon 1.4) bzw. demgegenüber um vier oder sieben AS verkürzt sein (Klone 2.4 bzw. 3.4). Keine dieser Proteinvarianten konnte erfolgreich überexprimiert werden, obwohl die Sequenzierung bei allen Varianten, außer bei Klon 3.4, zeigte, dass die codierenden Sequenz korrekt in den Vektor inseriert war.

5.1.2 Arabidopsis-Proteine

In Tab. 27 sind alle konstruierten *A. thaliana*-Lhca5-Klone aufgeführt, die zur Überexpression eingesetzt wurden.

Tab. 27: Zusammenstellung der Varianten des Lhca5 von *Arabidopsis thaliana*, deren Überexpression versucht wurde. Die Tabelle enthält den Namen des zur Überexpression verwendeten Klons und die N-terminale Sequenz mit Angabe der Quelle, auf die sich der N-Terminus bezieht. Außerdem ist vermerkt, ob die Sequenz das amber-Stoppocodon enthielt und ob die DNA-Sequenzierung (S) positiv ausfiel, bzw. ob Überexpression (Ü) und Rekonstitution (R) erfolgreich durchgeführt werden konnten.

Name	N-Terminus nach	N-terminale Sequenz	amber-stop	S	Ü	R
precursor						
51A.1	Jansson (1999)	MAVVLRRGGITGGFLHHRDASSVITRRISSVKA AGGGINPTVAVERATWLPGLNPP.....	ja	ja	ja	ja
matur						
52A.2	Jansson (1999)	AGGGINPTVAVERATWLPGLNPP.....	ja	ja	ja	ja
A1			nein	ja	ja	ja
B1	Kap. D4.3, MS-Saarbrücken	LPGLNPP.....	nein	ja	nein	-

Die Überexpression sowohl des murenen (Klon 52A2) als auch des Vorläufer-Proteins (Klon 51A1) des Lhca5 von *A. thaliana* war erfolgreich, wie durch Immunodetektion des isolierten Proteins mit einem gegen den N-Terminus des Lhca5 aus *Arabidopsis* gerichteten Antikörper (S. Jansson, Universität Umeå, Schweden) nachgewiesen werden konnte (Abb. 29) Die Überexpression war eindeutig stärker als im Fall des Lhca5-Vorläuferproteins von Tomate.

Die optimierte Auftrennung von IB-Proteinen des murenen Lhca5 von *A. thaliana* (52A2) im hochauflösenden PAA-Gradientengel (Kap. C3.5.1.1) führte zur Auftrennung von zwei distinkten Banden bei 24,2 bzw. 25,1 kDa. Ein Immunoblot mit anti-Lhca5-AK zeigte, dass beide Banden das Lhca5-Apoprotein darstellen (Abb. 30). Die apparente Molekularmasse der unteren Bande entsprach in etwa dem theoretischen Molekulargewicht, das mit Hilfe des „Expassy mass tools“ (<http://www.expassy.org/tools/peptide-mass.html>) aus den cDNA-Sequenzen errechnet werden konnte (24,3 kDa). Das Auftreten der zweiten Bande bei 25,1 kDa lässt sich mit der Codon-

Usage von JM101 erklären (siehe Sambrook und Russel, 2001). Dabei wird das eigentliche Stoppcodon (UAG, amber Stoppcodon) in bis zu 50% der Fälle überlesen, so dass das Protein erst am nachgeschalteten Stoppcodon des Vektors endet, und damit sechs zusätzliche Aminosäuren enthält. Deshalb wurde nachfolgend ein Klon des murenen *A. thaliana*-Lhca5 konstruiert (Klon A1), in dem das UAG-Codon gegen ein anderes Stoppcodon (UAA) ausgetauscht wurde, und das Protein erneut überexprimiert. In Abb. 30B ist eindeutig nur noch eine Proteinbande zu sehen.

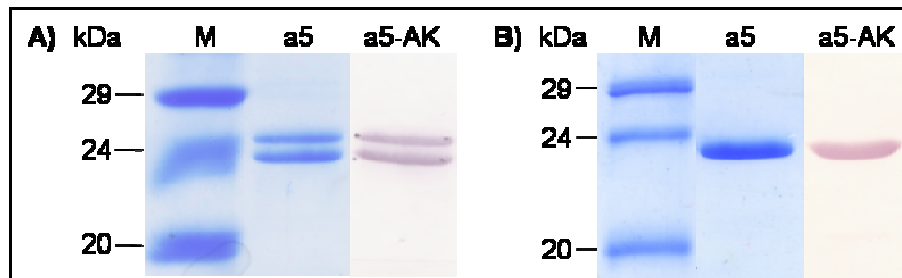


Abb. 30: Identifikation von in *E. coli* überexprimiertem murenen Lhca5-Apoproteinen. Zu sehen sind zwei mit Coomassie angefärbte denaturierende Polyacrylamidgele mit unterschiedlichen Lhca5 IB-Präparationen und der dazu gehörende, mit einem Lhca5 Antikörper inkubierten Immunoblot. A) die zur Überexpression verwendete *lhca5*-cDNA (Klon 52A2) enthielt das amber-Stoppcodon UAG (amber). Zur Überexpression des in B) gezeigten Proteins (Klon A1) wurde das amber-Stoppcodon gegen UAA ausgetauscht. M, Molekularmassenstandard; a5, Lhca5; a5-AK, Antikörper gegen Lhca5.

Als letzte *A. thaliana*-Lhca5-Variante sollte ein Protein exprimiert werden (Klon B1), dessen Beginn (LPGL.....) mit dem per Massenspektrometrie ermittelten Beginn des Tomaten-Lhca5 übereinstimmte (Kap. D4.3). Die Überexpression war allerdings nicht erfolgreich. Obwohl die codierende Sequenz laut Sequenzierung korrekt in den Vektor inseriert war, fand keine Überexpression statt und es konnten keine IBs isoliert werden.

5.2 Rekonstitution eines funktionellen LHC aus rekombinatem Lhca5-Apoprotein

Nach erfolgreicher Überexpression einiger Lhca5-Apoproteine sollte überprüft werden, ob diese auch Pigmente binden. Für die Rekonstitutionsexperimente (Kap. C2.4) wurden zunächst die drei erfolgreich überexprimierten Proteinvarianten (Vorläuferprotein aus Tomate, Klon 37.1; Vorläuferprotein (Klon 51A1) und mures Protein (Klon 52A2) aus *A. thaliana*; siehe Kap. D5.1) mit TE rekonstituiert.

In allen Fällen konnte in schwach denaturierenden Gelen eine pigmentierte Bande aufgelöst werden, die sich auf Höhe der Monomerbande der anderen rekonstituierten Lhca-Proteine (Lhca1 bis Lhca4) befand (Abb. 31). Damit konnte nachgewiesen werden, dass r-Lhca5 stabile Pigment-Protein-Komplexe bildet und somit tatsächlich ein LHC-Apoprotein ist.

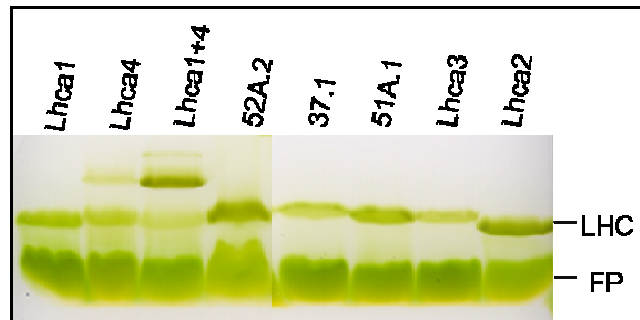


Abb. 31: Auftrennung von r-Lhca5 per schwach denaturierender Gelelektrophorese. Das Vorläuferprotein von Tomate und *A. thaliana* und das mature Protein von *A. thaliana* wurden mit Gesamtpigmentextrakt rekonstituiert. Als Vergleich wurden r-Lhca1-Lhca4 aufgetragen. 37.1, precursor-Lhca5 von Tomate, 52A.2, maturaer Lhca5 von *A. thaliana*; 51A.1, precursor-Lhca5 von *A. thaliana*.

Die folgenden Versuche zu Funktionalität, Pigmentbindung und Oligomerisierungsverhalten des r-Lhca5 wurden mit dem, dem maturaen Lhca5 aus *A. thaliana* entsprechenden Apoprotein (52A2) durchgeführt.

Zur Kontrolle der Funktionalität wurde das Lhca5-Apoprotein mit TE rekonstituiert und der r-LHC durch SDG-UZ von freiem Pigment getrennt (siehe Abb. 35). Die r-LHC-Monomere enthaltende SDG-Bande wurde entnommen und hinsichtlich ihrer 77 K-Fluoreszenzemission untersucht (Kap. C3.2). Die Spektren zeigten sowohl nach Chl *a*-Anregung bei 410 nm als auch bei Chl *b*-Anregung bei 470 nm ein Fluoreszenzmaximum bei 684 nm (Abb. 32). Ein langwelliger Fluoreszenzpeak war nicht zu sehen. Der Peak bei 652 nm, der durch die Fluoreszenz von ungekoppeltem Chl *b* entsteht war sehr niedrig, was auf einen effizienten Energietransfer von Chl *b* nach Chl *a* hinweist und die Funktionalität des Lhca5-Pigment-Protein-Komplexes bestätigt.

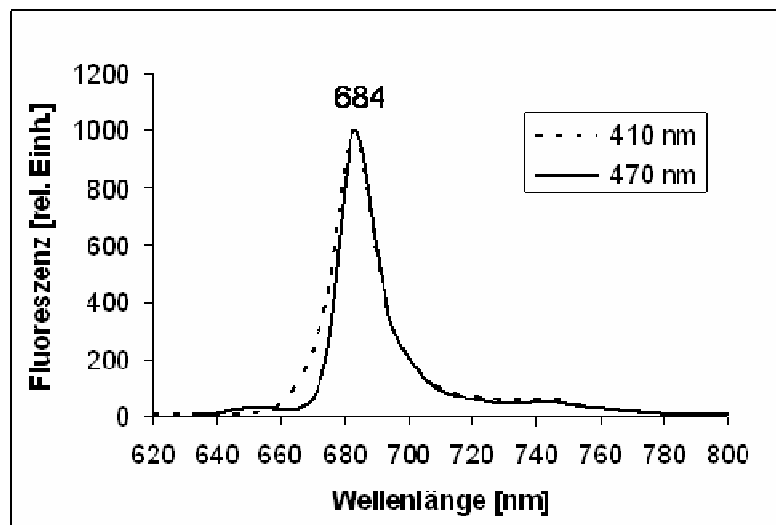


Abb. 32: Fluoreszenzemissionsspektren von rekonstituiertem Lhca5. Es wurde sowohl Chl *a* (bei 410 nm) als auch Chl *b* (bei 470 nm) angeregt. Die Spektren sind Mittelwertsspektren von fünf unabhängigen Rekonstitutionen.

5.3 Pigmentzusammensetzung des rekonstituierten Lhca5

Zur Untersuchung der Pigmentzusammensetzung wurde das Apoprotein ebenfalls mit TE rekonstituiert und per SDG-UZ aufgereinigt, um die r-LHC von nicht gebundenen Pigmenten abzutrennen. Im Anschluß wurden die Pigmente aus den entstandenen Monomerbanden extrahiert und per HPLC analysiert (Kap. C3.3). In Abb. 33 sind die Pigmentmengen bezogen auf 12 Chl aufgeführt, da nach der Röntgenstruktur des PSI aus Erbse (Ben-Shem et al., 2003) jedes LHC-Monomer 12 Chl bindet.

Ein Lhca5-Apoprotein koordiniert etwa drei Car, davon ein Großteil Lut (1,9) und lediglich substöchiometrische Mengen an Vio (0,3), Neo (0,3) und β -Car (0,2). Außerdem ligiert Lhca5 8,6 Chl *a* und 3,4 Chl *b*, was einem Chl *a/b*-Verhältnis von 2,6 entspricht. Die Spezifität der Pigmentbindung an Lhca5 zeigt sich im Vergleich mit dem zur Rekonstitution eingesetzten Totalextrakt. Lhca5 bindet vor allem Car in einer anderen Stöchiometrie als sie in den Ausgangspigmenten enthalten sind (Abb. 33).

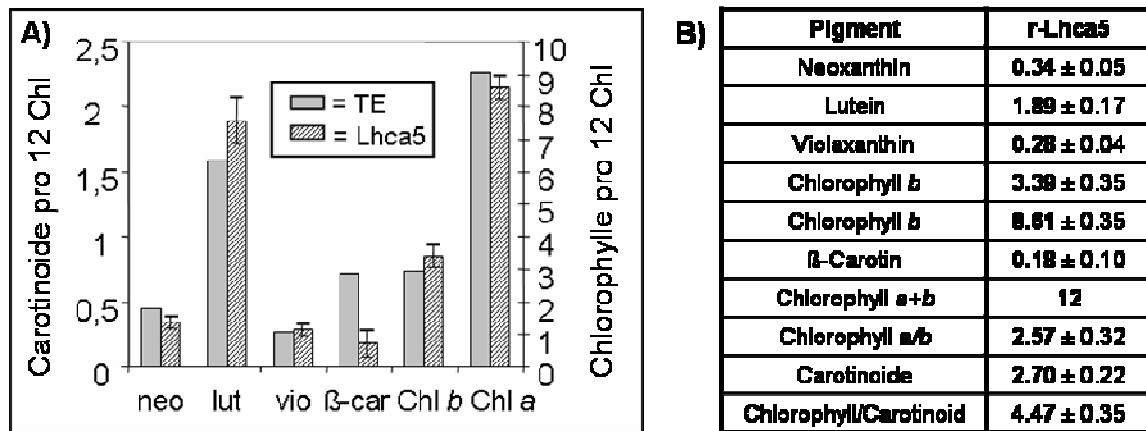


Abb. 33: Pigmentbindung von r-Lhca5. A) Vergleich der Pigmentstöchiometrie von r-Lhca5 mit der des zur Rekonstitution benutzten Pigmentextraktes (TE). B) Pigmentgehalt von r-Lhca5 bezogen auf 12 Chlorophylle. Mit Totalextrakt rekonstituierter Lhca5 wurde per SDG-UZ von freiem Pigment getrennt. Die Lhca5-Monomere enthaltende Bande wurde abgezogen, die Pigmente extrahiert und per HPLC analysiert. Die Daten stellen den Durchschnitt (\pm Standardabweichung) von sieben unabhängigen Lhca5-Rekonstitutionen dar.

5.4 Pigmentbedarf von Lhca5 zur Bildung stabiler Pigment-Protein-Komplexe

Untersuchungen an anderen Lhc-Proteinen haben gezeigt, dass die Bildung stabiler Pigment-Protein-Komplexe pigmentabhängig ist bzw. mit dem Chl *a/b*-Verhältnis in den fertigen LHC korreliert (z.B. Paulsen et al., 1990; Giuffra et al., 1996; Schmid et al., 1998). So lassen sich LHC mit einem hohen Chl *a/b*-Verhältnis, also mit einem hohen Anteil an Chl *a*, nicht ohne diese Chl-Spezies rekonstituieren, während für LHC mit einem niedrigen Chl *a/b*-Verhältnis, also einem hohen Anteil an Chl *b*, notwendigerweise Chl *b* im Rekonstitutionsansatz vorhanden sein muss.

Um den Pigmentbedarf von Lhca5 zu ermitteln, wurde das Apoprotein mit Pigmentmischungen rekonstituiert, die der Pigmentzusammensetzung des nativen LHCI-730 entsprachen (Chl a/b = 3,0, Lut/Vio/ β -Car = 1/0,55/0,45). Angegeben sind jeweils die molaren Verhältnisse. Wenn eines der Pigmente (Chl a, Chl b, β -Car, Vio oder Lut) fehlte, so wurde es durch die anderen Pigmentspezies der gleichen Pigmentklasse (Chl bzw. Car) ersetzt, so dass das Chl/Car-Verhältnis immer 6,0 betrug. In Abb. 34 sind die mittels schwach denaturierender LDS-PAGE analysierten Ansätze zu sehen.

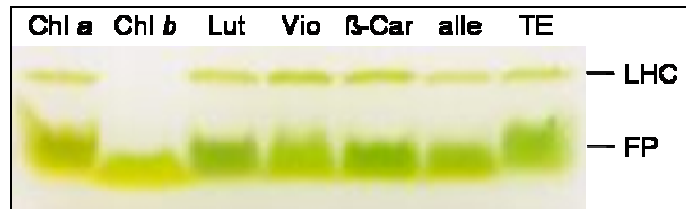


Abb. 34: Pigmentbedarf von r-Lhca5 zur Bildung stabiler LHC. Lhca5 wurde entweder mit Totalextrakt (TE), mit einem Gemisch von Einzelpigmenten in der Stöchiometrie des nativen LHCI-730 (alle) oder mit Pigmentmischungen, denen das angegebene Pigment fehlt, rekonstituiert (siehe Text). Die Auftrennung des Rekonstitutionsansatzes erfolgte über eine schwach denaturierende Gelelektrophorese. LHC, rekonstituierter LHC.

Es ist eindeutig zu erkennen, dass Lhca5 keine stabilen LHC bildete, wenn kein Chl b im Rekonstitutionsansatz vorhanden war. Das Fehlen von Chl a und einzelner Carotinoide hatte hingegen keinen Einfluß auf die LHC-Ausbeute.

5.5 Oligomerisierungsverhalten von Lhca5

Eine weitere Eigenschaft, in der sich die verschiedenen Mitglieder der Lhc-Proteinfamilie unterscheiden, ist ihre Fähigkeit zur Bildung von Oligomeren. Während LHCI**II**b nativ als Trimer vorkommt (Jackowski et al., 2001), bilden die Lhca-Proteine Dimere mit unterschiedlich starker Interaktion zwischen den beiden Partnern (Schmid et al., 1997, siehe auch Kap. D3), und die minoren LHC des PSII liegen *in vivo* in monomerer Form vor (Dunahay et al., 1997, Bassi und Dainese, 1991).

Die Auftrennung von Lhca5-Rekonstitutionsansätzen führte sowohl in schwach denaturierenden Gelen als auch in SDG zur Auftrennung einer FP-Bande und einer weiteren pigmentierten Bande, die auf Höhe der Monomerbanden der anderen Lhca-Proteine migrierte (Abb. 35). Dies zeigt, dass Lhca5 keine stabilen Homodimere bilden kann. Es bestünde jedoch die Möglichkeit einer Interaktion zwischen Lhca5 und einem der anderen Lhca-Proteine, also der Bildung von Heterodimeren. Dies wurde untersucht, indem Lhca5 mit jeweils einem der anderen Lhca-Proteine (Lhca1-4) zusammen in einem Ansatz rekonstituiert wurde.

In schwach denaturierenden Gelen (Abb. 35A) konnte danach wiederum nur eine Bande auf Höhe der Lhca1-4-Monomerbande aufgelöst werden. Das Gleiche war nach Auftrennung des Rekonstitutionsansatzes per SDG-UZ der Fall, wenn Lhca5 zusammen mit Lhca2 bis Lhca4 rekonstituiert wurde. Auch hier trat keine mit dem Lhca1/Lhca4-Dimer (LHCI-730) vergleichbare Bande auf (Abb. 35B). Im Gegensatz dazu ergab sich nach der Rekonstitution mit Lhca1 und

der Auftrennung per SDG-UZ eine eindeutig abgegrenzte Bande unterhalb der Monomerbande, die allerdings nicht direkt mit der Lhca1/Lhca4-Dimerbande komigrierte (Abb. 35B). Die Proteinanalyse der beiden nach gemeinsamer Rekonstitution von Lhca1 und Lhca5 erhaltenen Banden mittels denaturierender SDS-Page zeigte, dass beide Banden sowohl Lhca1 als auch Lhca5 enthielten. Dies deutet darauf hin, dass die untere Bande durch eine Interaktion der beiden Proteine zustande kommt.

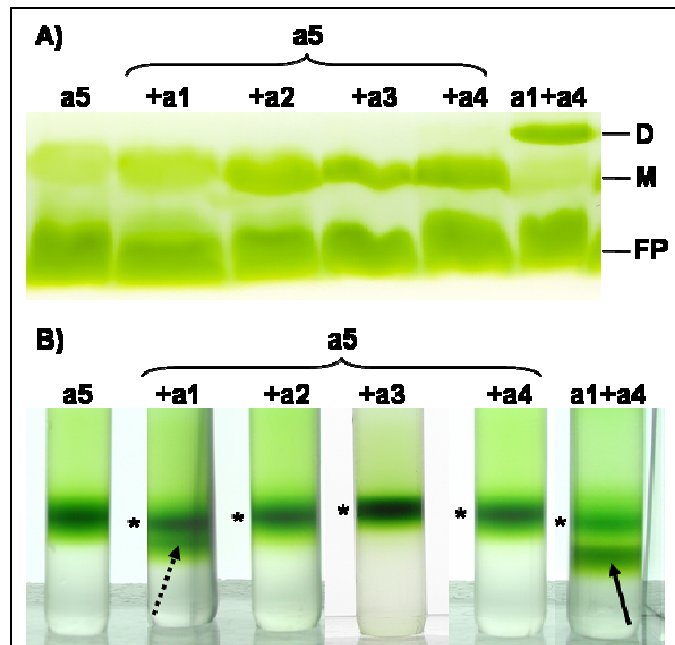


Abb. 35: Oligomerisierungsverhalten von Lhca5 in schwach denaturierenden LDS-Gelen und Saccharosedichtegradienten. Die Rekonstitutionen wurden mit Totalextrakt durchgeführt. Es wurde entweder Lhca5 alleine oder eine Kombination aus Lhca5 und dem angegebenen Lhca-Protein verwendet. Abb. A) zeigt das Bandenmuster nach Trennung der Rekonstitutionsansätze mittels schwach denaturierender LDS-Gelelektrophorese. In B) wurden entsprechende Ansätze per SDG-UZ aufgetrennt. Monomerbanden sind durch Sterne gekennzeichnet. Die Pfeile markieren eine potentielle (gestrichelt) bzw. tatsächliche (durchgehend) Dimerbande. a1-a5, Lhca1 bis Lhca5.

Um die Vermutung zu festigen, dass es sich bei der unteren DG-Bande um ein Dimer aus Lhca1 und Lhca5 handelt, wurde die Menge der beiden Proteine im Rekonstitutionsansatz so verändert, dass sich Lhca1/Lhca5-Verhältnisse von 1:10 bis 5:1 ergaben. Die daraus resultierende Bandenverteilung in SDG ist in Abb. 36A dargestellt. Die untere Bande war dann am stärksten, wenn das Proteinverhältnis im Ansatz 1:1 oder 5:1 betrug. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei dieser Bande um ein Interaktionsprodukt zwischen den beiden Proteinen handelt.

Analysiert man die Proteinzusammensetzung der beiden Banden im denaturierenden Gel (Abb. 36B), so fällt auf, dass jeweils die obere Bande das Proteinverhältnis des Rekonstitutionsansatzes reflektiert, während in der unteren Bande die beiden Proteine immer in nahezu äquimolarer Menge enthalten sind. Dies spricht eindeutig für eine Interaktion von Lhca1 und Lhca5.

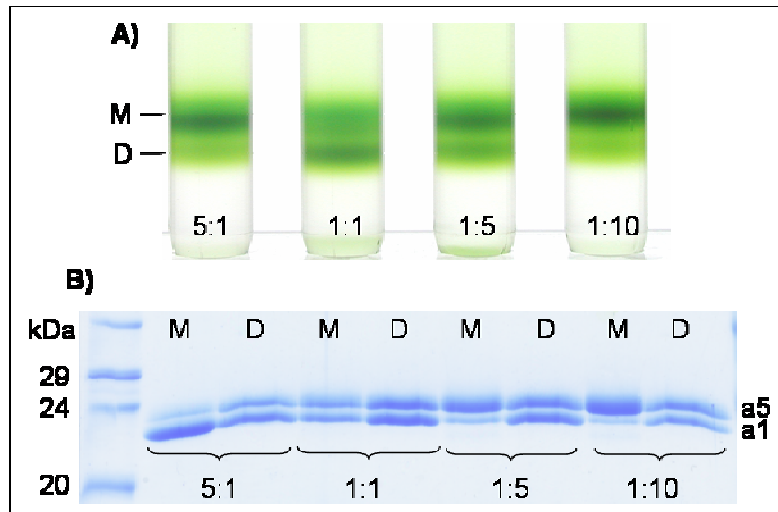


Abb. 36: Einfluß des Apoproteinverhältnisses auf die Dimerisierung von Lhca1 und Lhca5. Die Rekonstitutionen wurden mit Totalextrakt durchgeführt. Dabei wurde das Verhältnis der Lhca1 und Lhca5-Apoproteine im Rekonstitutionsansatz wie angegeben variiert. A) zeigt das Bandenmuster der in Saccharosedichtegradienten aufgetrennten Rekonstitutionsansätze. Die Proteinzusammensetzung der DG-Banden wurde dann mittels SDS-PAGE analysiert. In B) ist das entsprechende mit Coomassie gefärbte Gel zu sehen. M, Monomerbande; D, Dimerbande; a1, Lhca1; a5, Lhca5.

5.5.1 Fluoreszenzeigenschaften des Lhca1/Lhca5-Dimers

Von Lhca1 und Lhca4 ist bekannt, dass sich ihre spektroskopischen Eigenschaften im Zuge der Dimerisierung verändern. Besonders auffällig ist dabei die Verschiebung des 77K-Fluoreszenzemissionsmaximums hin zu längeren Wellenlängen (Schmid et al., 1997). Um zu sehen, ob die Interaktion von Lhca1 und Lhca5 einen ähnlichen Effekt hat, wurden sowohl die beiden Monomere als auch die oben erwähnte Lhca1/Lhca5-Dimerbande hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften untersucht (Kap. C3.2).

Die aufgenommenen Spektren sind in Abb. 37A dargestellt. Die Emissionsspektren der Monomere von Lhca1 und Lhca5 ähneln sich sehr und besitzen beide ein Maximum bei 684 nm (Abb. 37A). Das Spektrum der Lhca1/Lhca5-Dimerbande gleicht dem der Lhca1- und Lhca5-Monomere und unterscheidet sich damit wesentlich von dem des Lhca1/Lhca4-Dimers. Wie die Spektren der Lhca1- und Lhca5-Monomere besitzt auch das des Lhca1/Lhca5-Dimers ein Maximum bei 684 nm. Lediglich im an- bzw. absteigenden Bereich sind leichte Abweichungen zwischen Dimer- und Monomerspektrum zu erkennen (Abb. 37A).

Der Beitrag der Absorption der verschiedenen in den LHC gebundenen Pigmente zur Fluoreszenzemission lässt sich mit Hilfe eines Anregungsspektrums untersuchen (Kap. C3.2). Das Lhca1/Lhca4-Dimer unterscheidet sich hierbei deutlich von den entsprechenden Monomeren (Schmid et al., 1997). Vergleicht man die in Abb. 37B dargestellten Anregungsspektren, so scheint der Beitrag von Chl *b* und Carotinoiden (Absorptionsbereich von 450-480 nm) zur Lichtsammlung bei Lhca5-Monomeren größer zu sein als bei Lhca1-Monomeren. Zwischen dem Spektrum des Lhca1/Lhca5-Dimers und dem Summenspektrum der Lhca1- und Lhca5-Monomere sind im Bereich der Chl *b*- und Carotinoidabsorption ebenfalls leichte Unterschiede zu erkennen, was darauf hindeutet, dass es durch die Interaktion der beiden LHC

zu geringfügigen Veränderungen der Pigmentumgebung oder -orientierung kommt. Das Anregungsspektrum des Lhca1/Lhca4-Monomers unterscheidet sich in diesem Bereich jedoch sowohl stark vom Lhca1-Monomer als auch vom Lhca1/Lhca5-Dimer. Dies deutet darauf hin, dass die Dimerisierung auf die Pigmentanordnung im Lhca1/Lhca4-Dimer einen größeren Einfluß hat als im Lhca1/Lhca5-Dimer.

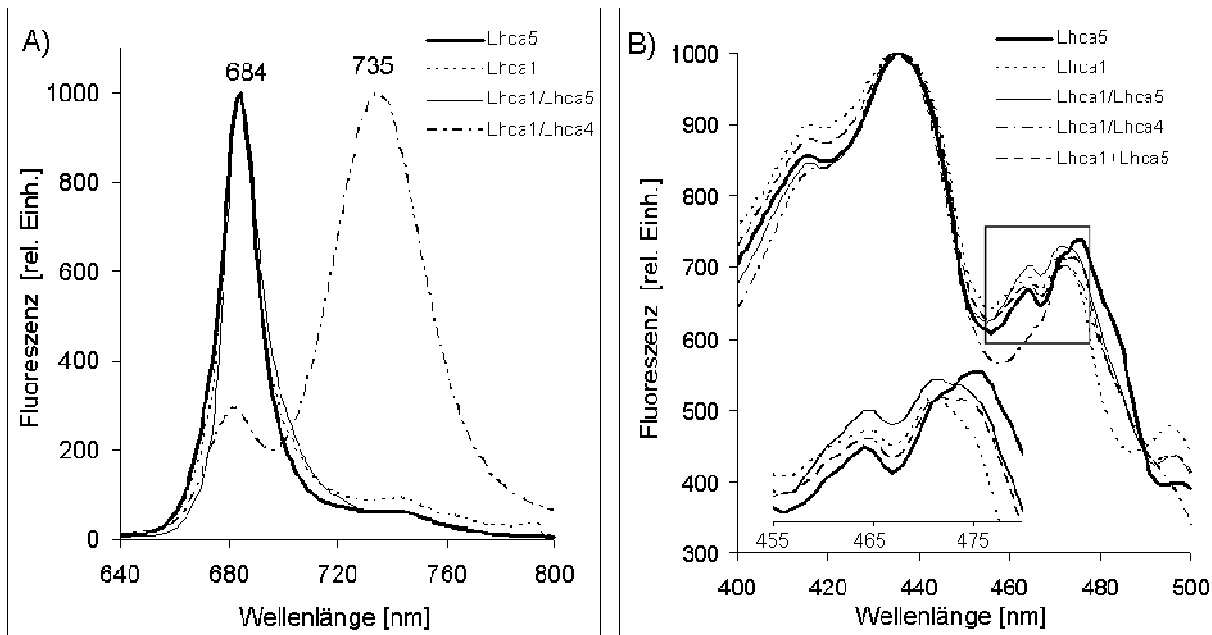


Abb. 37: Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften des rekonstituierten Lhca1/Lhca5-Dimers. In A) sind 77K-Fluoreszenzemissionsspektren von Lhca5- und Lhca1-Monomeren bzw. Lhca1/Lhca4- und Lhca1/Lhca5-Dimeren nach Chl *a* Anregung bei 410 nm gezeigt. Dazu wurden die entsprechenden Apoproteine mit Gesamtpigmentextrakt rekonstituiert und über SDG-UZ aufgereinigt. Für Abb. B) wurden von den gleichen Proben Anregungsspektren aufgenommen. Die Fluoreszenz wurde dafür bei der Wellenlänge der maximalen Fluoreszenzemission (684 nm für Lhca1- und Lhca5-Monomere und Lhca1/Lhca5-Dimere bzw. 729 nm für das Lhca1/Lhca4-Dimer) detektiert. Für genauere Angaben zu den Messparametern siehe Kap. C3.2, im unteren Bereich der Abb. B ist der eingerahmte Bereich vergrößert dargestellt. Lhca1+Lhca5, aus den Spektren der Lhca1 und Lhca5 Monomere errechnetes Summenspektrum.

E Diskussion

In der vorliegenden Arbeit ging es darum, mehr über die Pigment- und Proteinzusammensetzung des LHCI von Tomate zu erfahren. Dabei wurde zum einen die Pigment/Protein-Stöchiometrie nativer LHCI-Subfraktionen bestimmt und die Deepoxidierbarkeit des von den unterschiedlichen Lhca-Proteinen gebundenen Vio untersucht. Außerdem wurde die Proteinzusammensetzung des LHCI mittels Westernblot und Massenspektrometrie untersucht und ein dadurch entdecktes potentielles LHCI-Protein charakterisiert. Im Folgenden werden zunächst die Pigmentbindung und die Proteinzusammensetzung diskutiert, bevor im letzten Abschnitt auf interessante Aspekte, die sich daraus für die Vorstellung von der Struktur des PSI ergeben, eingegangen wird.

1. Pigmentbindung von LHCI-Proteinen

Trotz der hohen AS-Sequenzidentitäten zwischen den Proteinen der Lhc-Familie und der Tatsache, dass die meisten AS, die für LHCI_{IIb} als Chl-bindend beschrieben sind, in allen Lhc konserviert sind, binden die verschiedenen Lhc-Proteine Pigmente in spezifischen Stöchiometrien (Peter und Thornber, 1991; Bassi et al., 1993; Schmid et al., 1997; Pagano et al., 1998; Ruban et al., 1999; Croce et al., 2002a+b; Schmid et al., 2002a).

In dieser Arbeit wurden Pigment/Protein-Stöchiometrien für die LHCI-680- und LHCI-730-Subfraktionen des LHCI aus Tomate bestimmt (Tab. 18). Da es sich bei diesen Subfraktionen um Mischungen aus jeweils zwei Apoproteinen handelt (Abb. 11), wurden parallel dazu im Rahmen einer Diplomarbeit die Pigmentgehalte rekonstituierter Lhca-Proteine (Lhca1-Lhca4) untersucht, um Aussagen über die Pigmentzusammensetzung einzelner Lhca-Monomere machen zu können (Potthast 2002; Schmid et al., 2002a). Außerdem wurden von Croce et al. (2002a) und Castelletti et al. (2003) Pigmentdaten für nativen LHCI aus Mais (*Zea mays*) und *A. thaliana* und r-Lhca1-4 von *A. thaliana* veröffentlicht. Die aktuell für nativen LHCI und r-Lhca-Proteine bekannten Pigmentdaten sind in Tab. 28 zusammengestellt. Die Daten für r-Lhca-Proteine von Tomate wurden auf 12 Chl normiert, da in der Struktur des PSI-Holo Komplexes (Ben-Shem et al., 2003) 12 Chl pro LHCI-Monomer gefunden wurden. Die übrigen Daten sind entweder auf ein Apoprotein (native LHCI) oder auf 10 Chl (r-Lhca-Proteine von *A. thaliana*) normiert.

1.1 Vergleich der Pigmentzusammensetzung nativer Lichtsammelkomplexe

Betrachtet man die in dieser Arbeit für die nativen LHCI-Subfraktionen ermittelten Pigment/Protein-Stöchiometrien (Tab. 18), so fällt auf, dass beide LHCI-Fraktionen pro Apoprotein unterschiedliche Mengen an Chl enthalten. Während die für LHCI-730 bestimmte Menge von ~11,5 Chl pro Apoprotein gut mit der in der PSI-Kristallstruktur (Ben-Shem et al., 2003) auf-gelösten Anzahl von zwölf Chl pro LHCI-Monomer übereinstimmt, enthielten die LHCI-680-Präparationen pro Apoprotein deutlich weniger Chl (9,0). Damit enthält LHCI-680 pro Apoprotein so viel Chl wie CP26 (Croce et al., 2002b). Auch das Chl *a/b*-Verhältnis ist mit 2,5 in LHCI-680 und 2,2 in CP26 vergleichbar. LHCI-730 besitzt dagegen ein etwas höheres Chl *a/b*-

Verhältnis von 3,0, und stimmt diesbezüglich mit CP29 überein (Pascal et al., 1999). Allerdings bindet LHCI-730 mit 11,5 Chl wesentlich mehr Chl als CP29, das nur acht Chl enthält.

Tab. 28: Vergleich der Pigmentzusammensetzung von nativen und rekonstituierten LHCI. Aufgeführt sind die in dieser Arbeit für die LHCI-Subfraktionen LHCI-680 und LHCI-730 von Tomate (*L. esc.*) ermittelten (Tab. 17), und die in Schmid et al. (2002) für rekonstituierte Tomaten-Lhca veröffentlichten Pigmentstöchiometrien. Außerdem sind von Croce et al. (2002a) und Castelletti et al. (2003) veröffentlichte Daten für native LHCI aus *Arabidopsis thaliana* (*A. th.*) und Mais (*Z. mays*) bzw. rekonstituierte Lhca von *A. thaliana* aufgeführt. Die Daten der r-Lhca von Tomate wurden auf 12 Chl normiert. 1) Croce et al., 2002; 2) Schmid et al. 2002; 3) Castelletti et al., 2003.

LHC	Neo	Vio	Lut	β -Car	Σ Car	Chl <i>b</i>	Chl <i>a</i>	Chl <i>a/b</i>	Chl <i>a+b</i>	Chl/Car	Quelle
n-LHCI <i>Z. mays</i>	-	0,6	1,2	0,4	2,2	2,1	7,9	3,8	10	4,6	1)
n-LHCI <i>A. th.</i>	-	0,6	1,1	0,5	2,2	2,3	7,7	3,3	10	4,6	1)
n-LHCI-730 <i>L. esc.</i>	-	0,5	1,1	0,4	2,0	3,0	8,6	2,9	11,5	5,9	Tab. 17 Kap.D1.2
r-LHCI-730 <i>A. th.</i>	0,1	0,8	1,2	0,4	2,5	3,0	9,0	3,0	10	4,0	1)
n-LHCI-680 <i>L. esc.</i>	-	0,4	0,9	0,4	1,7	2,6	6,4	2,5	9	5,1	Tab. 17 Kap.D1.2
r-Lhca1 <i>L. esc.</i>	0,3	0,3	1,7	0,1	2,4	2,7	9,3	3,5	12	5,0	2)
r-Lhca1 <i>A. th.</i>	0,1	1,1	1,8	-	3,0	2,0	8,0	4,0	10	3,3	1)
r-Lhca2 <i>L. esc.</i>	0,1	0,2	1,7	0,1	2,1	3,7	8,3	2,3	12	5,8	2)
r-Lhca2 <i>A. th.</i>	-	0,5	1,5	-	2,0	3,5	6,5	1,9	10	5,0	3)
r-Lhca3 <i>L. esc.</i>	0,4	0,3	2,2	0,2	3,1	1,7	10,3	6,1	12	3,9	2)
r-Lhca3 <i>A. th.</i>	-	0,7	1,6	0,6	2,9	1,4	8,6	6,0	10	3,5	3)
r-Lhca4 <i>L. esc.</i>	0,1	0,2	1,6	0,1	2,0	3,3	8,7	2,6	12	6,1	2)
r-Lhca4 <i>A. th.</i>	-	0,5	1,5	-	2,0	3,0	7,0	2,3	10	4,9	1)

Für LHCI-Holokomplexe aus *A. thaliana* und Mais wurden Chl/Protein-Stöchiometrien von 10 beschrieben (Croce et al., 2002a). Addiert man die in der vorliegenden Arbeit im LHCI-730 (23 Chl) und LHCI-680 (18 Chl) von Tomate gefundene Chl-Menge, so ergibt sich eine vergleichbare Chl/Protein-Stöchiometrie von 10,2. Allerdings ist das Chl *a/b*-Verhältnis bei Mais und *A. thaliana* mit 3,8 bzw. 3,3 höher als bei den hier untersuchten LHCI-Subfraktionen von Tomate, was darauf hindeutet dass der LHCI verschiedener Pflanzen unterschiedliche Präferenzen für Chl *a* und Chl *b* besitzt. Dagegen spricht allerdings, dass rekonstituierte LHCI-Monomere mit Apoproteinen von Tomate bzw. *A. thaliana* sehr ähnliche Chl *a/b*-Verhältnisse besitzen (Tab. 28), was wiederum bedeuten würde, dass zwar in den verschiedenen r-Lhca manche Chl-Bindungsstellen mit einer anderen Chl-Spezies besetzt sein können als im nativen LHCI, dass dies aber nicht pflanzenspezifisch ist. Die Existenz von Chl-Bindungsstellen, die keine eindeutige Präferenz für eine der Chl-Spezies besitzen, wird durch Versuche mit rekombinanten Lhca- und Lhcb-Proteinen bestätigt, die zeigten, dass das in r-LHC gefundene Chl *a/b*-Verhältnis zumindest in einem gewissen Rahmen mit dem im Rekonstitutionsansatz vorhandenen Chl *a/b*-Verhältnis korreliert (Gerlach, 2003, Hobe et al., 2003).

Die Diskrepanz zwischen der in isoliertem LHCI gefundenen Chl-Gesamtmenge und der in der PSI-Struktur (Ben-Shem et al., 2003) aufgelösten Chl-Anzahl lässt sich zumindest im Fall der von mir untersuchten LHCI-Subfraktionen damit erklären, dass in LHCI-680-Präparationen

Lhca2 und Lhca3 als Monomere vorliegen (Abb. 11B), während man davon ausgeht, dass sie im PSI-LHCI-Holokomplex Dimere bilden (Jansson et al., 1996; Croce und Bassi, 1998; Ganeteg et al., 2001), die jedoch instabiler sind als das Lhca1/Lhca4-Dimer und deshalb im Zuge der Isolation zu Monomeren zerfallen (siehe auch Kap. E4.2). Durch diese Monomerisierung kommt es dann möglicherweise zum Verlust von Chl, deren Bindung durch die Dimerbildung stabilisiert wird. Solche „linker“-Chl an den Kontaktflächen der LHCI-Monomere konnten in der PSI-Struktur aufgelöst werden (Ben-Shem et al. 2003).

Im Gegensatz zum Chl-Gehalt, ist der Gehalt an Carotinoiden in beiden LHCI-Fractionen etwa gleich groß. Sowohl LHCI-680 als auch LHCI-730 enthalten bezogen auf ein Apoprotein insgesamt etwa zwei Carotinoide (1,8 in LHCI-680 und 1,9 in LHCI-730, Tab. 18). Dies ist vergleichbar mit den Daten für LHCI-Holokomplexe aus *A. thaliana* und Mais, in denen jeweils 2,2 Carotinoide pro Monomer gefunden wurden (Croce et al., 2002a). Allerdings wurden hierbei pro Apoprotein nur 10 Chl gefunden, wodurch für den LHCI aus *A. thaliana* und Mais ein leicht niedrigeres Chl/Car-Verhältnis (4,6) zustande kommt als für den LHCI-680 (5,1) und LHCI-730 (5,9) von Tomate. Insgesamt scheint der LHCI von *A. thaliana* also etwas mehr Carotinoide zu binden als der LHCI von Tomate. Im Wesentlichen ist die Menge der in nativem LHCI gebundenen Carotinoide allerdings mit der der minoren LHCII vergleichbar, die ebenfalls zwei Carotinoide pro Monomer binden (siehe Tab. 4). Dies bestätigt die Annahme, dass in allen LHCI-Proteinen mindestens zwei Carotinoide (sehr wahrscheinlich in die L1 und L2-Bindungsstellen) gebunden sein müssen, um stabile LHC zu bilden (Morosinotto et al., 2003b). Nativer LHCI enthält damit deutlich weniger Carotinoide als LHCIIb, der insgesamt vier Carotinoide ligiert, davon zwei Lut und jeweils ein Vio und Neo (Liu et al., 2004).

Bezüglich ihrer Carotinoidzusammensetzung unterscheiden sich die LHCI der verschiedenen Pflanzen nicht wesentlich. Sowohl im untersuchten LHCI-680 und LHCI-730 von Tomate (Tab. 18) als auch im LHCI-Holokomplex von Mais und *A. thaliana* (Croce et al., 2002a) wurden etwa ein Lut pro Apoprotein und jeweils substöchiometrische Mengen an Vio und β -Car entdeckt (Tab. 28). Damit unterscheidet sich die Carotinoidzusammensetzung des LHCI von der des LHCII auch dadurch, dass nativer LHCI an Stelle des von LHCIIb, CP26 und CP29 (Giuffra et al., 1996; Caffarri et al., 2001; Croce et al., 2002b) gebundenen Neo, β -Car bindet.

1.2 Vergleich der Pigmentbindung nativer LHCI-Subfraktionen mit der rekonstituierten Lhca-Proteine

Chlorophyllbindung

Der Vergleich der Chl-bindung von nativem LHCI-680 mit r-Lhca (Tab. 28) spricht ebenfalls dafür, dass es sich bei den im Zuge der LHCI-680-Isolation „verlorenen“ Chl überwiegend um Chl a handelt, da das Chl *a/b*-Verhältnis des LHCI-680 mit 2,5 deutlich geringer ist als der Durchschnitt der Chl *a/b*-Verhältnisse von r-Lhca2 und r-Lhca3 von 4,2. Normiert man die Daten des nativen LHCI-680 auf 12 Chl, so ergibt sich ein Chl *b*-Gehalt von 3,5. Dieser ist höher als der durchschnittliche Chl *b*-Gehalt von r-Lhca2 und r-Lhca3 (2,7) und auch höher als die in nativem LHCI (2,1-3,1) gefundene Chl *b*-Menge, was wiederum dafür spricht, dass das geringere Chl *a/b*-Verhältnis von LHCI-680 durch den Verlust von Chl a zustande kommt.

Erste Dimerisierungsexperimente mit r-Lhca1 und r-Lhca4 deuteten ebenfalls auf das Vorkommen zusätzlicher Chl in LHCI-730 hin (Schmid et al., 1997). Allerdings stimmt in neueren Daten (Tab. 28) der Durchschnitt der Chl *a/b*-Verhältnisse von r-Lhca1 und r-Lhca4 (3,1) mit dem von LHCI-730 (3,0) überein, was eher nicht auf die Bindung zusätzlicher Chl im Zuge der Dimerisierung hindeutet. Diesbezüglich stellt sich auch die Frage warum in r-Lhca2 und/oder r-Lhca3 zusätzlich gebundene Chl enthalten sein sollten, obwohl diese ja wie LHCI-680 ebenfalls als Monomere vorliegen (Abb. 11). Möglicherweise kommen die unterschiedlichen Chl *a/b*-Verhältnisse deshalb auch durch die oben erwähnte Bindungsflexibilität einiger Chl-Bindungsstellen zustande.

In diesem Zusammenhang wäre es gut zu wissen, ob rekonstituierte Lhca-Proteine tatsächlich die gleiche Anzahl an Pigmenten binden wie der native LHCI, oder ob manche Pigmente nicht erst durch die Interaktion von zwei LHCI-Monomeren stabil gebunden werden können, so dass sie in den monomeren r-Lhca nicht vorhanden sind. Dazu wäre es allerdings nötig das Pigment/Protein-Verhältnis rekonstituierter Lhca-Proteine zu bestimmen. Dies scheitert z.Zt. noch daran, dass IB-Präparationen von Lhca-Proteinen mit Bakterienprotein verunreinigt sind. Versuche zur vollständigen Abtrennung der bakteriellen Proteine vom überexprimierten Lhca-Protein mittels nativer Flachbett-IEF und Gelfiltrations- oder Nickel-Sepharosesäulen wurden bereits unternommen. Allerdings ergaben sie kein zufriedenstellendes Ergebnis (Gerlach 2003, Keuchel, 2003).

Auffällig ist auf jedenfall, dass die beiden LHCI-Subfraktionen jeweils einen LHC mit hohem (Lhca1 mit 3,5 bzw. Lhca3 mit 6,1) und einen mit relativ niedrigem Chl *a/b*-Verhältnis (Lhca2 mit 2,3 bzw. Lhca4 mit 2,6) enthalten.

Carotinoidbindung

Interessanterweise scheinen die verschiedenen r-Lhca neben unterschiedlichen Chl-Präferenzen auch unterschiedliche Carotinoidbindungskapazitäten zu besitzen. So enthalten r-Lhca2 und r-Lhca4 insgesamt nur zwei, r-Lhca3 insgesamt jedoch drei Carotinoide (siehe Tab. 19, Tab. 28). In r-Lhca1 von Tomate werden etwa 2,5 Carotinoide (Tab. 19; Wehner et al., 2004), in dem von *A. thaliana* drei Carotinoide (Croce et al., 2002a) gefunden. Normiert man die Daten für den r-Lhca1 aus *A. thaliana* ebenfalls auf 12 statt auf 10 Chl, bindet er sogar 3,6 Carotinoide. Damit werden in nativem LHCI regelmäßig weniger Carotinoide (1,8-1,9 für Tomate bzw. 2,2 für *A. thaliana*) gefunden (Tab. 18, Croce et al., 2002a) als der aus den Daten der verschiedenen r-Lhca errechnete Durchschnittswert erwarten ließe (2,2 pro Apoprotein für Tomate und 2,5 für *A. thaliana*). Möglicherweise besitzt die dritte Carotinoidbindungsstelle in Lhca1 insgesamt eine geringere Bindungsaffinität, so dass darin gebundene Carotinoide während der Isolation von nativem LHCI leichter „verloren“ gehen können. Eine instabilere Carotinoidbindung wäre auch mit den nichtstöchiometrischen Carotinoidmengen in r-Lhca1 von Tomate in Einklang zu bringen (Tab. 19, Tab. 28). Für Lhcb1 wurde z.B. bereits gezeigt, dass die N1-Bindungsstelle eine geringere Bindungsaffinität für Vio und Lut hat (Croce et al., 1999a; Hobe et al., 2000). Ein gegenüber dem nativen LHCI erhöhter Carotinoidgehalt der r-Lhca würde dann allerdings bedeuten, dass die Carotinoidbindung an diese Bindungsstelle in r-Lhca stabiler ist als in nativem LHCI.

Nicht nur die Menge, sondern auch die Stöchiometrie der im nativen LHCI gebundenen Carotinoide unterscheidet sich von der der entsprechenden r-Lhca (siehe Tab. 28). Allerdings gibt es dabei auch Unterschiede zwischen den r-Lhca4 von *A. thaliana* und Tomate.

So wird von den r-LHC mit Tomaten-Apoproteinen Vio in wesentlich geringerer Menge gebunden als es in den in dieser Arbeit untersuchten LHCI-Subfraktionen enthalten ist (0,2-0,3 gegenüber 0,5;) und wie es für LHCI-Holokomplexe aus *A. thaliana* und Mais (jeweils 0,6) bzw. r-Lhca-Proteine von *A. thaliana* (0,5-1,1) beschrieben wurde. Dies deutet darauf hin, dass *in vitro* abhängig von der Rekonstitutions- bzw. Aufreinigungsmethode ein Teil des Vio durch andere Carotinoide ersetzt werden kann. Außerdem binden alle r-Lhca-Proteine von Tomate, wie aus Tab. 28 ersichtlich wird Neo, wenn es im Rekonstitutionsansatz enthalten ist. Möglicherweise ersetzt dieses Xanthophyll in r-LHCI β -Car, das wiederum in nativem LHCI in größeren Mengen (0,4-0,5) als in r-Lhca-Proteinen (0,05-0,2) enthalten ist. Außerdem ist die Lut-Menge im nativen LHCI mit 1,1 in LHCI-730 bzw. 0,9 in LHCI-680 aus Tomate und 1,2 bzw. 1,1 im LHCI von Mais und *A. thaliana* niedriger als in r-Lhca-Proteinen, in denen zwischen 1,5 und 2,2 Lut gefunden wurden.

Zusammengenommen deuten die Carotinoidbindungsdaten darauf hin, dass Lhca-Proteine mindestens eine Carotinoidbindungsstelle besitzen, in die unterschiedliche Carotinoide gebunden werden können, je nachdem in welchen Mengen sie während der Rekonstitution vorhanden sind. Für die minoren Antennen des PSII (Pagano et al., 1998, Ros et al., 1998; Bassi et al., 1999) und für r-Lhcb1 (Hobe et al., 2000; Jahns et al., 2001) wurde eine Flexibilität von Carotinoidbindungsstellen bereits beschrieben. Es wird postuliert, dass die L2, N1 und V1-Bindungsstellen zwar eine Präferenz für ein bestimmtes Carotinoid besitzen, dass aber je nach „Angebot“ auch andere Carotinoide gebunden werden können, während die L1-Stelle immer Lut enthält. Für Bindungsstellen mit flexiblen Bindungseigenschaften im LHCI sprechen auch die von mir durchgeführten Rekonstitutionen mit Lut und Vio als einzigen Carotinoiden (Tab. 19). Die so rekonstituierten LHC weisen alle ein Chl *a/b*-Verhältnis auf, das mit dem von mit TE rekonstituierten LHC vergleichbar ist. Auch die Menge an gebundenem Lut war in beiden Fällen gleich, während die detektierte Vio-Menge der Summe von β -Car, Neo und Vio in mit TE rekonstituierten LHC entsprach, so dass die Gesamtanzahl an Carotinoiden und das Verhältnis zwischen β - β -Car (β -Car, Neo, Vio) und β - ϵ -Car (Lut) konstant blieb.

Aufgrund der unterschiedlichen Bezugsgrößen die in den verschiedenen Studien für die Normierung der Pigmentdaten verwendet werden, und den unterschiedlichen Rekonstitutions- und Aufreinigungsmethoden ist es schwer zu entscheiden, ob die beschriebenen Unterschiede bei der Pigmentbindung der LHCI-Proteine verschiedener Pflanzen durch die Untersuchungsparameter verursacht werden, oder ob es sich um intrinsische Eigenschaften der Proteine handelt. Deshalb wäre es sinnvoll den nativen LHCI aus verschiedenen Pflanzen mit der gleichen Methode zu isolieren, und die Pigmentzusammensetzung und das Pigment/Protein-Verhältnis zu bestimmen. Außerdem würde es sich anbieten rekombinante Lhca-Proteine von *A. thaliana* und Tomate ebenfalls unter gleichen Bedingungen zu rekonstituieren und aufzureinigen, um zu sehen, ob die vor allem bei der Carotinoidbindung beobachteten Unterschiede durch die AS-Sequenz bedingt sind, oder ob sie durch die unterschiedliche

Rekonstitutionsmethoden und/oder unterschiedlich stringente Aufreinigungsmethoden verursacht werden.

Fluoreszenzeigenschaften des LHCI-680

Im Hinblick auf die Fluoreszenzeigenschaften des LHCI-680 erwies sich der Vergleich von nativen und r-LHC als hilfreich. In verschiedenen Studien schwanken die Angaben über das Tieftemperatur-Fluoreszenzmaximum von LHCI-680-Präparationen zwischen 680 und 690 nm, und auch die Form der Fluoreszenzspektren weist Unterschiede auf (Bassi und Simpson, 1987; Ikeuchi et al., 1991; Knoetzel et al., 1992). Die 77K-Fluoreszenzemissionsspektren der verschiedenen in dieser Arbeit untersuchten LHCI-680-Fraktionen differierten ebenfalls stärker als die Spektren der entsprechenden LHCI-730-Fraktionen. Zum einen schwankte die Wellenlänge, bei der das Fluoreszenzmaximum lag, weshalb das in Abb. 10B gezeigte Mittelwertsspektrum verschiedener LHCI-680-Fraktionen einen „Doppelpeak“ aufweist. Zum anderen war auch die in den langwelligen Bereich reichende Schulter in verschiedenen LHCI-Präparationen unterschiedlich stark ausgeprägt.

Eine Erklärung für dieses differierende Fluoreszenzverhalten lässt sich aus Fluoreszenzmessungen von r-Lhca2 und r-Lhca3 ableiten (Abb. 38; Potthast, 2002). Diese zeigten, dass Lhca2 und Lhca3 unterschiedliche Fluoreszenzmaxima aufweisen (bei 689 nm bzw. 680 nm), wodurch sich der „Doppelpeak“ im Spektrum des nativen LHCI-680 erklären lässt. Außerdem weisen beide r-LHC eine langwellige Fluoreszenzkomponente auf, die aber unterschiedlich stark ausgeprägt ist (Abb. 38A). Bei r-Lhca2 ist es lediglich eine in den langwelligen Bereich hineinragende Schulter (~702 nm), bei r-Lhca3 ist dagegen ein ausgeprägter Peak bei ~720 nm zu erkennen. Das Summenspektrum der beiden LHC (Abb. 38B) ist dem Fluoreszenzspektrum des LHCI-680 (Abb. 10B) sehr ähnlich, woraus geschlossen werden kann, dass die langwellige Fluoreszenz auch in nativen LHCI-680-Monomeren vorkommt.

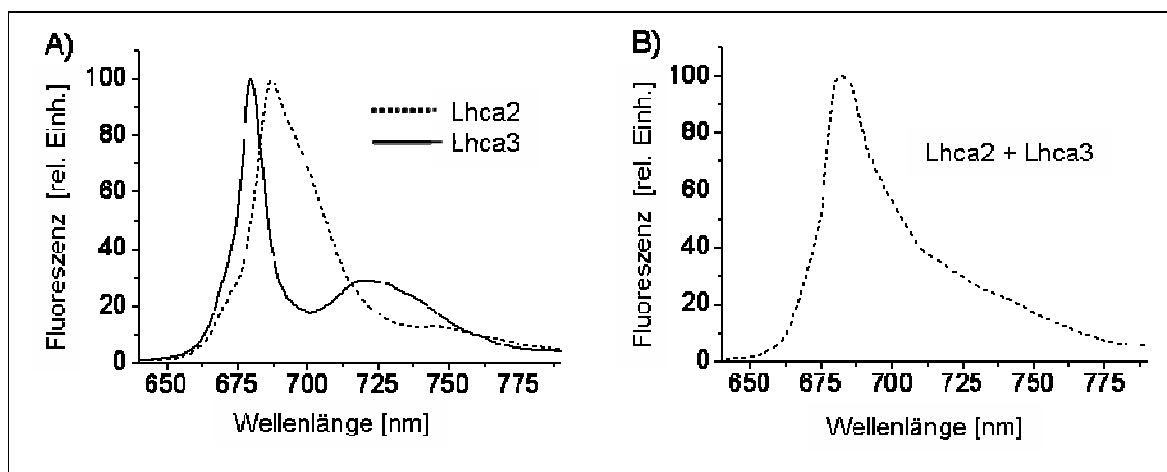


Abb. 38: Fluoreszenzspektren von r-Lhca2 und r-Lhca3 (A) und das daraus errechnete Mittelwertsspektrum (B). Es wurde Chl a (bei 410 nm) angeregt. Die Spektren in Abb. A sind Mittelwertsspektren von fünf unabhängigen Rekonstitutionen.

Messungen an r-Lhca2 und r-Lhca3 von *A. thaliana* bestätigten das Auftreten einer langwelligen Fluoreszenz bei beiden r-LHC (Castelletti et al., 2003), und *in vivo* Untersuchungen an Lhca2- und Lhca3-antisense-Pflanzen zeigten ebenfalls, dass langwellige Fluoreszenzkomponenten mit dem Vorkommen von Lhca2 (702 nm) und Lhca3 (735 nm) assoziiert sind (Ganeteg et al., 2001). Außerdem wurde in einer spektroskopischen Studie mit LHCI-Holokomplex von *A. thaliana* neben den langwelligen Chl, die dem Lhca1/Lhca4-Dimer zugeordnet werden, noch eine zweite langwellig absorbierenden Chl-Gruppe entdeckt, die mit Lhca2/Lhca3-Dimeren in Verbindung gebracht wurde (Ihalainen et al., 2000).

Da der Versuch *in vitro* Lhca2/Lhca3-Dimere zu bilden, bisher nicht erfolgreich war (siehe E4.2), konnte nicht untersucht werden, ob durch die Bildung von Homo- oder Heterodimeren aus Lhca2 und Lhca3 ebenfalls eine Verstärkung der langwelligen Fluoreszenz und eine Verschiebung des Maximums hin zu längeren Wellenlängen erfolgt, wie es für Lhca4 bei der Interaktion mit Lhca1 beobachtet wurde (Schmid et al., 1997).

Geht man davon aus, dass bei den langwelligen Chl des LHCI vibronische Energiezustände auftreten, die dazu führen, dass von dieser Energie an den PSI-Kern weitergeleitet werden kann, und nimmt man weiterhin an, dass Lhca2 und Lhca3 *in vivo* interagieren, so sind zwei Wege für die Excitonenweiterleitung vom LHCI zum PSI-Kern vorstellbar: einmal über die langwelligen Chl des Lhca4 im LHCI-730 und desweiteren über die langwelligen Chl des Lhca3 in LHCI-680 (Schmid et al., 2002a). Dies würde gut zu der Vermutung passen, dass diese Lhca-Proteine auch an der Photoprotektion beteiligt sind (siehe E1.3).

1.3 Deepoxidation von LHCI-Proteinen

Nachdem sich bei den Pigmentuntersuchungen gezeigt hatte, dass die nativen LHCI-Subfraktionen Vio enthalten, wurde untersucht in wie weit dieses durch die VDE zu Zeaxanthin umgesetzt werden kann und damit am Xanthophyllzyklus beteiligt ist. Um Aussagen über unterschiedliche Deepoxidationseigenschaften der verschiedenen Lhca-Proteine machen zu können, wurden neben nativen LHCI-Subfraktionen auch r-Lhca-Proteine verwendet.

Die Deepoxidierungsexperimente zeigten, dass in den verschiedenen r-LHCI-Monomeren unterschiedliche Mengen des gebundenen Vio durch die VDE umgesetzt werden können. Außerdem ist die Umwandlungsgeschwindigkeit in den verschiedenen r-Lhca unterschiedlich (Abb. 13). Für r-Lhcb1 wurde von Jahns et al. (2001) bereits beschrieben, dass in der N1-Stelle gebundenes Vio für die VDE leichter zugänglich ist und schneller umgesetzt werden kann als in L2 gebundenes. Außerdem wurde von Ruban et al. (1999) postuliert, dass in die periphere V1-Bindungsstelle des LHCI**IIb** (siehe Abb. 3, Liu et al., 2004) gebundenes Vio im ständigen Austausch mit der Lipidphase steht. Deshalb ist anzunehmen, dass dessen Umwandlungskinetik mit der von freiem Vio vergleichbar ist (Wehner et al., 2004). Geht man davon aus, dass die LHCI-Komponenten eine dem LHCI**IIb** vergleichbar Struktur und damit ähnliche Carotinoid-bindungsstellen haben, könnten die hier beobachteten Unterschiede in der Deepoxidierbarkeit dadurch zustande kommen, dass Vio in den verschiedenen Lhca in unterschiedliche Bindungsstellen ligiert wird.

In r-Lhca3 wird Vio mit einer schnellen Kinetik fast vollständig umgesetzt (Abb. 13). Dies spricht für die Bindung des Vio in die periphere V1-Bindungsstelle, wie es auch von Castelletti et al. (2003) postuliert wird. Die beiden anderen Bindungsstellen (L1 und L2) wären dann mit Lut besetzt, da Lhca3 insgesamt drei Carotinoide bindet (Tab. 19, Tab. 29).

Für r-Lhca4 fehlt in der Kinetik die schnelle Komponente (Abb. 13) und es waren nach 2 h etwa 50% des Vio umgesetzt. Aufgrund des Verlaufs der Kinetik ist jedoch davon auszugehen, dass auch das restliche Vio noch umgesetzt werden könnte. Dies deutet darauf hin, dass Vio in diesem Fall in einer relativ schlecht zugänglichen Bindungsstelle gebunden ist. Geht man davon aus, dass L1 und L2 in LHC immer besetzt sein müssen, wäre dies da r-Lhca4 nur zwei Car ligiert die L2-Bindungsstelle. (Tab. 19, 29). Passend dazu postulieren Morosinotto und Mitarbeiter (2003b), dass Vio in r-Lhca4 nicht mit der N1- oder V1-Bindungsstelle assoziiert ist. Da r-Lhca2 wie r-Lhca4 ebenfalls nur zwei Carotinoide bindet (Tab. 19, 29), wäre für diesen r-LHC demnach eine mit r-Lhca4 vergleichbare Kinetik zu erwarten. Dies ist jedoch nicht der Fall (Abb. 13). In r-Lhca2 können 20% des Vio mit einer schnellen Kinetik umgesetzt werden, was für eine unspezifische Bindung oder eine Bindung in die V1 oder N1-Stelle spricht. Das restliche Vio ist für die Deepoxidierung nicht zugänglich, was bedeuten würde, dass an L2 gebundenes Vio im Fall des r-Lhca2 nicht umgesetzt werden kann.

Für r-Lhca1 von *A. thaliana* wurde die Bindung von drei Carotinoiden beschrieben (Croce et al., 2002) und auch der r-Lhca1 von Tomate bindet mehr als zwei Carotinoide (Tab. 19, 29; siehe auch Kap. E1.2). Damit wäre die schnelle Umsetzung von etwa 20% des Vio in r-Lhca1 auf in die V1- oder N1-Bindungsstelle gebundenes Vio zurückzuführen, während die langsame Umsetzung des restlichen Vio mit dessen Bindung in die L2-Stelle zu erklären wäre (Abb. 13). Croce et al. (2002a) und Morosinotto et al. (2002a) favorisieren die N1-Bindungsstelle als dritte Carotinoidbindungsstelle des Lhca1.

In einer ähnlichen *in vitro*-Deepoxidationsstudie, in der r-Lhca1 und r-Lhca4 von *A. thaliana* untersucht wurden, wurde wie auch in der vorliegenden Untersuchung für Lhca4 ein höherer Deepoxidationsgrad beobachtet als für Lhca1 (Morosinotto et al., 2002b). Allerdings war die Menge des insgesamt umsetzbaren Vio wesentlich geringer als in unseren Versuchen (7% für Lhca1 und 12% für Lhca4 gegenüber 35% für Lhca1 und 45% für Lhca4 in unseren Experimenten), was möglicherweise auf eine verringerte Aktivität der verwendeten rekombinanten VDE zurückzuführen ist. In der *A. thaliana*-Studie war auch der DEPS von r-Lhcb1 und r-Lhcb6 niedriger als der von r-Lhca1 und r-Lhca4, lediglich r-Lhcb5 wies einen höheren DEPS auf. Im Gegensatz dazu wurde für r-Lhcb1, der mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten *in vitro*-Methode deepoxidiert wurde (Jahns et al., 2001), ein deutlich höherer DEPS beobachtet als für die hier untersuchten r-Lhca.

Der DEPS des in der vorliegenden Arbeit *in vitro* deepoxidierten LHCI-730 und LHCI-680 war niedriger (LHCI-730 0,17; LHCI-680, 0,26; Tab. 21) als aus den Daten der entsprechenden r-Lhca-Monomere zu erwarten wäre (Lhca1+4, 0,32; Lhca2+3, 0,53; Tab. 20), d.h., dass Vio im nativen Lhca1/Lhca4-Dimer schlechter umzusetzen war als in den entsprechenden rekonstituierten Monomeren. Der Verlauf der Kinetiken der nativen LHCI-Sufraktionen entsprach dabei der Kombination der Kinetiken, die für die beiden in den Subfraktionen enthaltenen r-Lhca beobachtet wurden. Möglicherweise führen durch die Dimerisierung verursachte Strukturänderungen der LHCI-Monomere dazu, dass sich die Zugänglichkeit des

Vio verschlechtert. Da der DEPS der *in vivo* deepoxidierten LHCI-Subfraktionen jedoch exakt mit den entsprechenden *in vitro*-Daten übereinstimmt (siehe Tab. 21), könnte die verstärkte Deepoxidierung der r-Lhca auch daher rühren, dass diese noch unspezifisch gebundenes Vio enthalten. Außerdem fällt auf, dass der DEPS des LHCI-680 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* höher ist als der des LHCI-730. Daraus lässt sich schließen, dass der erhöhte DEPS des LHCI-680 *in vitro* nicht die Folge der Monomerisierung ist, sondern eine intrinsische Eigenschaft des LHCI-680 darstellt, und wohl auf die verstärkte Deepoxidierbarkeit von Lhca3 im Vergleich zu Lhca4 zurückzuführen ist. Außerdem bestätigt es die Annahme, dass die insgesamt verstärkte Depoxidation der r-LHC-Monomere eher auf unspezifisch gebundenes Vio als auf einen Strukturunterschied in Monomer und Dimer zurückzuführen ist, da sonst die nativen LHCI-680 Monomere auch stärker deepoxidiert werden müssten. Der höhere DEPS des LHCI-PSI-Holokomplex im Vergleich zu dem der LHCI-Subfraktionen sowohl nach *in vivo* als auch *in vitro* Deepoxidation, deutet daraufhin, dass im PSI-LHCI-Komplex zusätzliches (unspezifisch gebundenes?) umsetzbares Vio vorhanden ist, das bei der Isolation der LHCI-Komplexe verloren geht.

Unsere Daten (Tab. 21) zeigen in Übereinstimmung mit früher veröffentlichten *in vivo*-Daten, dass der DEPS des LHCI niedriger ist als der von LHCII (Thayer und Björkmann, 1992; Schäfer et al., 1994; Färber et al., 1997; Verhoeven et al., 1999). Die Angaben über die Höhe des DEPS der LHCII-Komponenten liegen in den verschiedenen Studien für LHCIIb bei 0,6-0,9, für CP29 zwischen 0,4-0,7, und für CP24 und CP26 bei ~0,7, während für den PSI-LHCI-Holokomplex DEPS von 0,3-0,4 ermittelt wurden. Legt man die für r-Lhca ermittelten Daten zugrunde (siehe obige Diskussion und Tab. 20), könnte der niedrigere DEPS des LHCI darauf zurückzuführen sein, dass ein Großteil des von Lhca1 und Lhca2 gebundenen Vios nicht oder nur sehr langsam deepoxidiert werden kann. Möglicherweise hat dieses Vio eher eine strukturelle oder licht-sammelnde Funktion und keine Schutzfunktion. Wenn dem so wäre, kämen als Ort einer potentiellen photoprotektiven Funktion des im Xanthophyllzyklus gebildeten Zea im LHCI überwiegend Lhca3 und Lhca4 in Frage.

Allerdings ist immer noch unklar welche Rolle der Xanthophyllzyklus im PSI spielt. Bisher konnte für das PSI im Gegensatz zum PSII kein Zea-abhängiges NPQ beobachtet werden. Dies und die Tatsache, dass PSI bei Raumtemperatur weniger fluoresziert als PSII wird von Morosinotto et al. (2003b) dahingehend interpretiert, dass die LHCI ständig in einer „quenching“ Konformation vorliegen, wie sie im LHCII erst durch die Bindung von Zea induziert wird. Damit müsste Zea im LHCI eine andere Funktion ausüben als im LHCII. Da eine Photoinhibition des PSI durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die auf dessen reduzierender Seite entstehen, bisher nur unter niedrigen Temperaturen und bei kälteempfindlichen Pflanzen beobachtet wurde (Havaux und Davaud, 1994), spielt Zea möglicherweise eher eine Rolle bei der Detoxifikation von ROS. Damit hätte im LHCI gebundenes Zea auch eine Schutzfunktion für das PSII, da am PSI gebildete ROS auch das PSII schädigen können (Tjus et al., 2001).

2. Die Proteinzusammensetzung des LHCI ist heterogener als bisher angenommen

Nachdem auf Genebene für den LHCI höherer Pflanzen mehr potentielle *Lhca*-Gene beschrieben sind, als bisher Proteine entdeckt wurden, wurde in dieser Arbeit die Proteinzusammensetzung des LHCI von Tomate hinsichtlich des Vorkommens zusätzlicher Lhca-Proteine untersucht. Dazu wurde eine Kombination von hochauflösender eindimensionaler und für Membranproteine optimierter zweidimensionaler Gelelektrophorese mit Westernblotexperimenten und massenspektrometrischen Proteinanalysen benutzt.

Mittels hochauflösender SDS-Gelelektrophorese konnten im Molekulargewichtsbereich der LHCI-Proteine von Tomate fünf distinkte Proteinbanden aufgelöst werden (Abb. 20). Vier dieser Banden werden durch Coomassie etwa gleichstark angefärbt und wurden bisher aufgrund ihres apparenten Molekulargewichts und dem Laufverhalten rekombinanter Lhca-Proteine (Schmid et al., 2002a) den bekannten LHCI-Proteinen Lhca1 bis Lhca4 zugeordnet. Die fünfte, weniger stark gefärbte Bande, tritt zwar regelmäßig in PSI-Präparationen und in LHCI-730-Fractionen aus Tomate auf (Abb. 10), allerdings mit unterschiedlicher Intensität (Abb. 20). Eine solche zusätzliche Bande mit ähnlichem Migrationsverhalten wurde bisher lediglich für das PSI von Gerste beschrieben (Knoetzel et al., 1992).

Durch Immunoblot-Experimente mit Lhca-spezifischen Antikörpern konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der per 1D-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinbanden nicht homogen ist. So reagierte der Lhca4-AK nicht nur mit der Lhca4- sondern auch mit dem unteren Bereich der Lhca1-Bande und der Lhca1-AK erkennt neben der Lhca1- auch den unteren Bereich der Lhca2- und die zusätzliche Bande (Abb. 21). Ähnlich verhält es sich in 2D-Gelen, in denen zum einen für Lhca4 und Lhca1, aber auch für Lhca3 Isoformen mit unterschiedlichen Molekulargewichten detektiert wurden (Abb. 26). Da die Spezifität der verwendeten AK per Westernblot mit überexprimierten Lhca-Proteinen überprüft wurde (Abb. 22), bedeutet dies, dass es sich hierbei nicht um unspezifische AK-Bindungen handelt, sondern dass die genannten Proteine in Isoformen mit unterschiedlichem apparentem Molekulargewichten vorkommen. Dass die Lhca3-Isoformen mit unterschiedlichem Molekulargewicht in 1D-Gelen nicht aufgetrennt wurden, könnte daran liegen, dass dem Trenngel der 2D-Gelelektrophorese kein Sammelgel vorgeschaltet war (Kap. C3.5.2.3), und somit die Trennstrecke etwas länger war. Lhca2 kam als einziges der Lhca-Proteine bezüglich Laufstrecke bzw. Molekulargewicht lediglich in einer Isoform vor.

Die Ergebnisse der Immunoblots werden durch die massenspektrometrischen Analysen bestätigt (Tab. 22, 24). Lhca1, Lhca3 und Lhca4 konnten auch hier in Banden/Spots mit unterschiedlichem apparentem Molekulargewicht detektiert werden, während Lhca2 nur in einer Bande/Spotreihe enthalten war. Insgesamt zeigen diese Beobachtungen, dass die Zuordnung der im 1D-Gel aufgetrennten Banden zu einem der Lhca-Proteine eine Vereinfachung darstellt. Konsequenterweise folgt daraus, dass die Bestimmung der Lhca-Stöchiometrie über densitometrische Auswertung coomassiegefärbter Gele wie sie von Ballottari et al. (2004) vorgenommen wird fehleranfällig ist, da eine Bande aus mehreren Lhca-Proteinen zusammen-

gesetzt sein kann. Außerdem zeigt dies, dass die allgemeine Annahme, der LHCI setze sich lediglich aus vier unterschiedlichen Apoproteinen zusammen, ebenfalls zu einfach ist.

Isoformen, die sich in ihrem Molekulargewicht unterscheiden wurden auch schon für Proteine des PSII (Huber et al., 2001; Gomez et al., 2002) oder PSI-Kernproteine (Obokata et al., 1993) beschrieben. Auch das Auftreten von Lhca-Proteinen in elektrophoretisch unterschiedlichen Isoformen wurde schon beobachtet. So wurde im PSI von Spinat in 1D-Gelen eine zusätzliche Bande mit einem dem Lhca2 vergleichbaren Migrationsverhalten beobachtet (Ikeuchi et al., 1991). In der gleichen Studie wurden mittels einer Kombination von nativer Elektrophorese in der ersten und denaturierender Elektrophorese in der zweiten Dimension zwei Lhca3-Isoformen mit unterschiedlichem Molekulargewicht aufgelöst. Außerdem wurden durch ESI-MS Studien an Tomaten-PSI jeweils zwei Isoformen von Lhca1 und Lhca2 entdeckt (Zolla et al., 2002).

Im Gegensatz zu der von uns verwendeten MS/MS-Methode, die mit tryptisch verdauten Proteinen durchgeführt wurde, haben Zolla et al. das Molekulargewicht unverdauter LHCI-Proben detektiert, und die Proteine durch den Vergleich der gemessenen Massen mit den theoretischen Molekularmassen von LHCI-Proteinen identifiziert. Da sich die detektierten Lhca1-Isoformen (*cab6a* und *cab6b*) nur in drei AS unterscheiden (siehe Erläuterung zu Tab. 2), und die AS-Sequenzabdeckung in unseren MS/MS-Messungen nur zwischen 12% (Lhca1) und 36% (*cab12*) lag, ist es sehr gut möglich, dass wir die Peptide, durch die sich die Lhca1-Formen unterscheiden lassen nicht detektieren konnten. Genauso verhält es sich für Lhca2. Hierbei kommt erschwerend hinzu, dass Lhca2 in unseren Experimenten massenspektrometrisch wesentlich schwieriger nachzuweisen war als die anderen Lhca-Proteine. So konnten in den MS/MS-Analysen von 1D-Banden insgesamt nur drei Lhca2-Peptide detektiert werden. Dies sind weniger Peptide als für die übrigen Lhca gefunden wurden (Lhca1 = sechs; Lhca3 = fünf, Lhca4 = vier Peptide). Außerdem konnten z.B. in 2D-Spot F keine Lhca2-Peptide gefunden werden, obwohl er eindeutig durch den Lhca2-AK erkannt wurde (Tab. 24, Abb. 28), und das obwohl normalerweise durch MS/MS geringere Proteinmengen nachgewiesen werden können als durch AK-Detektion (Rehm, 2002). Möglicherweise liegt dies daran, dass sich die Lhca2-Peptide schlechter aus der Gelmatrix extrahieren lassen oder ihre Ionisierung weniger effizient verläuft als bei den Peptiden der anderen Lhca-Proteine.

In den von uns durchgeführten MS-Messungen zur Molekularmassenbestimmung der Tomaten-Lhca (Tab. 25), die mit den Messungen von Zolla et al. (2002) vergleichbar sind, konnten für Lhca1 und Lhca2 ebenfalls zwei Isoformen detektiert werden. Zusätzlich dazu gelang auch hier, wie schon in den MS/MS-Messungen, die Unterscheidung der Genprodukte der beiden Lhca-Isoformen *cab11* und *cab12*, und es wurden Molekularmassen detektiert, die möglicherweise einem neuen Lhca-Protein zuzuordnen sind (siehe E3.1). Hinweise auf *in vivo*-Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungen, durch die das unterschiedliche elektrophoretische Laufverhalten erklärt werden könnten ergaben diese Untersuchungen jedoch nicht.

Eine weitere mögliche Erklärung für das Auftreten von Isoformen eines Proteins mit abweichenden Molekulargewichten ist die unterschiedliche Prozessierung von Vorläuferproteinen, wodurch mature Proteine mit unterschiedlich langen N-Termini entstehen. Stauber et al. (2003) konnte dies für Lhcb-Proteine von *C. reinhardtii* nachweisen. Aber auch für Lhc-Proteine höherer Pflanzen sind differentielle Prozessierungen bereits beschrieben worden (Pichersky et al., 1987b; Clark et al., 1989; Obokata et al., 1993), wobei die beobachteten

Größenunterschiede mit den von uns per Gelelektrophorese detektierten vergleichbar sind. In den hier präsentierten MS/MS-Daten (sowohl aus 1D- als auch aus 2D-Auftrennungen, Tab. 22, 24) konnten allerdings keine nur einmal tryptisch geschnittenen Peptide, also potentielle N-Termini, gefunden werden, so dass nicht bewiesen werden kann, dass die unterschiedlichen Lhca-Isoformen in diesem Fall ebenfalls durch differentielle Prozessierung zustande kommen.

2.1 Woher rührt die Spotvielfalt in zweidimensionalen Gelen?

Neben der Auftrennung von unterschiedlich großen Lhca-Isoformen führte die Untersuchung von LHCI-Proteinen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese auch zur Detektion von Isoformen mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten (pI). Aufgrund der theoretischen Molekulargewichte und der theoretischen pI (Tab. 2) wäre für die Lhca-Proteine etwa das in Abb. 39A dargestellte Spotmuster zu erwarten gewesen. Überraschenderweise wurden jedoch wesentlich mehr Proteinspots aufgelöst (Abb. 26, Abb. 39B). Immunoblotanalysen zeigten, dass jedes der Lhca-Proteine in vier bis fünf Isoformen mit unterschiedlichem pI, aber gleichem Molekulargewicht vorkommt, wodurch sich horizontale Spotreihen ausbilden (Abb. 26). Eine ähnliche Auftrennung konnte auch für Lhc-Proteine von *C. reinhardtii* (Hippler et al., 2001, Stauber et al., 2003) und die Proteine des OEC von *A. thaliana* (Friso et al., 2004) beobachtet werden. Zusätzlich zu den Spots mit unterschiedlichen pI wurden für Lhca1, Lhca3 und Lhca4 wie oben bereits beschrieben jeweils zwei Spotreihen mit unterschiedlichem Molekulargewicht aufgelöst (Abb. 28). Die pI der per 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten Lhca-Proteinspots können Tab. 23 entnommen werden.

Die relative Verteilung der Spotreihen lässt sich im Fall der Lhca-Proteine aus Tomate mit dem theoretischen pI der Lhca-Proteine korrelieren (Tab. 2). So reicht die Lhca2-Reihe am weitesten in den sauren Bereich, während die Spotreihe mit den höchsten pI durch Lhca3-Isoformen gebildet wird. Dies passt zu den theoretischen pI, der bei Lhca2 bei 4,99 und bei Lhca3 bei 5,95 liegt. Lhca1 besitzt einen pI von 5,22, und auch die entsprechende Spotreihe liegt zwischen der von Lhca2 und Lhca3. Die beiden Isoformen von Lhca4 (cab 11 und cab12), die einen pI von 5,34 bzw. 5,15 besitzen, ließen sich auf Grund dieses Unterschieds in 2D-Gelen voneinander trennen. Eine ähnliche Spotvielfalt konnte auch für den LHCI von *A. thaliana*, Erbse und Mais beobachtet werden (Harms, 2005).

Das Auftreten von Proteinisoformen mit unterschiedlichen pI und/oder Molekulargewichten kann verschiedene Ursachen haben. Einerseits kann es wie oben beschrieben durch differentielle Prozessierung des N-Terminus zustande kommen. Eine weitere Möglichkeit sind posttranslationale Proteinmodifikationen, wie Acetylierungen des N-Terminus und Phosphorylierungen von Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten (siehe Berg et al., 2003).

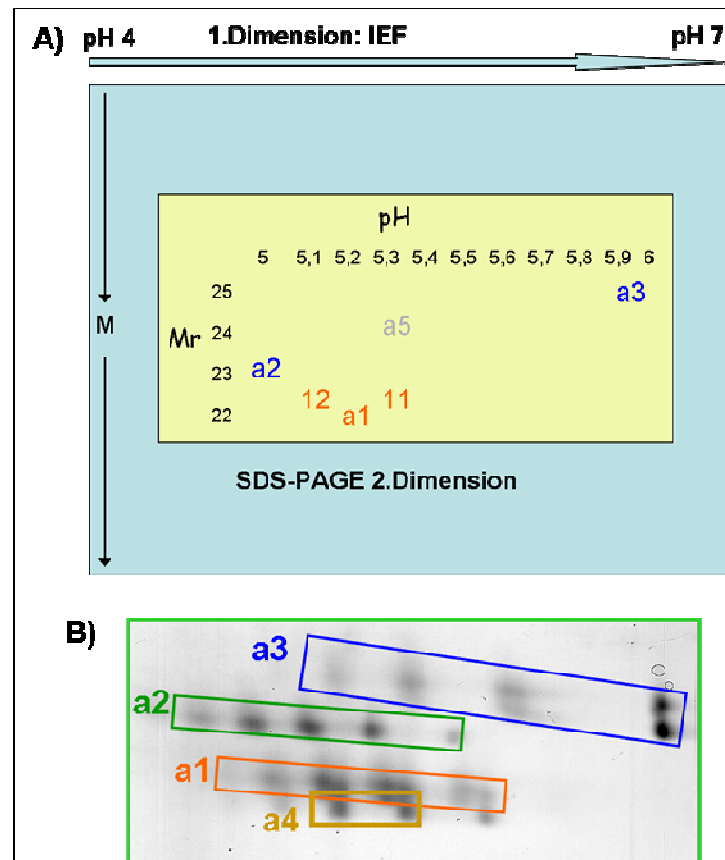


Abb. 39: Vergleich des theoretisch nach Auftrennung der LHCI-Proteine in zweidimensionalen Gelen zu erwartenden Spotmusters mit dem tatsächlich gefundenen Auftrennungsmuster. Abb. A) wurde aufgrund der theoretischen Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte der Lhca-Proteine erstellt (Tab. 2). Abb. B) stellt die Auftrennung des LHCI-Bereichs einer PSI-Präparation dar (siehe Kap. D4.2). a1-a5; Lhca1-Lhca5; 11, 12, cab11- und cab12-Isoformen des Lhca4.

Für Proteine des PSII sind Phosphorylierungen eindeutig nachgewiesen (Bennett, 1991). So wird z.B. der LHCII im Zuge der „state transition“ reversibel phosphoryliert und wandert dann zum PSI (Allen und Forsberg, 2001; Haldrup et al., 2001). Phosphorylierungen können neben der Verschiebung des pI auch die Veränderungen der elektrophoretischen Mobilität, d.h. des apparenten Molekulargewichts, eines Proteins zur Folge haben. Dies wurde z.B. für das D1-Protein des PSII (Elich et al., 1992) und die minore PSII-Antenne CP29 (Bergantino et al., 1998) beschrieben. Über den Phosphorylierungszustand der LHCI-Proteine gibt es unterschiedliche Angaben. In ^{32}P -Markierungsexperimenten konnten unter Bedingungen, bei denen verschiedenen PSII-Proteine eindeutig phosphoryliert vorlagen, für LHCI-Proteine aus Spinat und Mais keine Phosphorylierungen nachgewiesen werden (Dunahay et al., 1987; Bassi et al., 1988). Im Gegensatz dazu reagierten Anti-Phosphoserin- und Anti-Phosphothreonin-Antikörper mit den untersuchten LHCI-Proteinen aus Gerste, was auf eine starke Phosphorylierung von Lhca1 bis Lhca4 hindeutet (Knoetzel et al., 1995), und die von uns in den 2D-Gelen beobachtete Spotvielfalt bzw. die unterschiedlich mobilen Isoformen in den 1D-Gelen erklären könnte. In den von mir untersuchten PSI-Präparationen aus Tomate konnte allerdings mittels Phosphoproteindetektion keine Phosphorylierung festgestellt werden (Abb. 27). In den als Referenz verwendeten Thylakoiden wurde eine Phosphorylierung des LHCII beobachtet, während im LHCI-Bereich eindeutig keine Phosphorylierungen zu erkennen waren. Dieses

Ergebnis wird durch die MS/MS-Daten gestützt, in denen ebenfalls keine Phosphorylierungen nachgewiesen werden konnte (Tab. 22, 24), so dass Phosphorylierungen als Grund für die unterschiedlichen Isoformen wohl nicht in Frage kommen. Genau so wenig konnten in den MS/MS-Daten Acetylierungen detektiert werden. Auch die Untersuchung der Molekularmassen ganzer Proteine (Kap. D4.3) lieferte keine Hinweise auf *in vivo*-Modifikationen.

In Versuchen zur 2D-Auftrennung von in *E. coli* überexprimierten Lhca-Proteinen (Harms, 2005) traten ebenfalls Isoformen mit unterschiedlichem pI auf. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei der in der 2D-Gelen beobachteten Spotvielfalt zumindest teilweise um ein präparatives Artefakt und nicht um physiologisch relevante Modifikationen handelt, da in *E. coli* exprimierte Pflanzenproteine keine physiologisch relevanten posttranslationalen Modifikationen tragen.

Als eine physiologisch nicht relevante, artifizielle Proteinmodifikationen, die sich auf die elektrophoretischen Eigenschaften (vor allem den pI) eines Proteins auswirken kann, kämen vor allem Carbamylierungen in Betracht. Diese entstehen durch die Reaktion des N-Terminus oder der Seitenketten von Lysin oder Arginin mit Isocyansäure. Letztere bildet sich, wenn Harnstoff, der bei 2D-Gelelektrophoresen zur Denaturierung und Solubilisierung der Proteine verwendet wird, erwärmt wird. In unseren MS/MS-Daten (Tab. 22, 24) konnten allerdings keine Carbamylierungen nachgewiesen werden. Wobei zu bedenken ist, dass die Proteinsequenzabdeckung der MS/MS-Experimente mit 12-36% relativ gering ist und z.B. keine N-Termini identifiziert werden konnten: somit bedeutet „in den MS/MS-Experimenten nicht nachgewiesen“ nicht unbedingt, dass nicht an einer anderen Stelle des Proteins eine der beschriebenen Modifikationen vorhanden sein kann.

Bei den in 1D-Gelen beobachteten Isoformen mit unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität handelt es sich allerdings im Gegensatz zu den 2D-Spots wahrscheinlich um native Isoformen, die zudem noch tomatenspezifisch zu sein scheinen, da rekombinante Lhca-Proteine in 1D-Gelen keine derartige Variabilität des Laufverhaltens zeigen, und auch in anderen Pflanzen (*A.thaliana*, Erbse, Mais) keine Isoformen mit unterschiedlichem Laufverhalten in 1D-Gelen beobachtet wurden (Harms, 2005). Wodurch die in dieser Arbeit in 1D-Gelen beobachteten, bezüglich ihres apparenten Molekulargewichts unterschiedlichen Proteinisoformen zustande kommen, konnte allerdings nicht geklärt werden. In den massenspektrometrischen Messungen wurden weder posttranslationale Modifikationen noch differentiell prozessierte N-Termini gefunden. Auch konnten z.B. die beiden Lhca4-Isoformen nicht eindeutig einer Bande zugeordnet werden. Möglicherweise wird das unterschiedliche Laufverhalten auch durch eine ungenügende Solubilisierung der Proteine hervorgerufen, so dass es zu Populationen mit unterschiedlich hohem Sekundärstrukturanteil und damit einer Ladungsheterogenität kommt. Oder das Auftreten von einem Protein in unterschiedlichen Banden kommt durch dessen Degradation im Laufe der Elektrophorese zustande. Dabei stellt sich allerdings die Frage, warum dies nur bei den Lhca-Proteinen von Tomate auftreten sollte.

Um weiterhin zu klären woher die Proteinvielfalt in 2D-Gelen kommt, wurde bereits mit Starklicht-Experimenten begonnen, um zu sehen ob sich die Spotanzahl oder Verteilung unter Lichtstress verändert, was ein Hinweis auf die physiologische Herkunft der 2D-Isoformen wäre (Harms, 2005). Bisher sind hierzu noch keine Ergebnisse vorhanden. Eine weitere Möglichkeit

der Herkunft der Isoformen auf den Grund zu gehen wäre es, ganze Proteine aus den 2D-Spots und/oder 1D-Banden zu eluieren und massenspektroskopisch zu untersuchen, statt diese wie bisher tryptisch zu verdauen. Dabei gestaltet sich allerdings sowohl die Elution als auch die Entfernung des an den Proteinen gebundenen SDS (das bei der Massenspektrometrie stört) als problematisch. Eine letzte Möglichkeit bestünde auch darin, die Banden oder Spots so lange zu untersuchen bis 100% der Peptide eines Proteins detektiert sind, und in diesen Daten nach Modifikationen zu suchen.

2.2 Der LHCI von Tomate enthält zusätzliche Lhca-Apoproteine

Zusätzlich zu den elektrophoretisch unterschiedlichen Isoformen der bekannten Lhca-Proteine, konnten durch die massenspektrometrischen Analysen definitiv zwei neue Lhca-Proteine entdeckt werden. Zum einen wurde eine bisher nur auf Genebene beschriebene Lhca4-Isoform (*cab12*, Schwartz et al., 1991) zum ersten Mal auf Proteinebene nachgewiesen (Abb. 24). Dies zeigt, dass durch MS/MS-Messungen die Unterscheidung zweier Proteine, die bis auf fünf AS identisch sind, möglich ist und unterstreicht die Sensitivität dieser Methode. In 2D-Gelen ließen sich die beiden Formen aufgrund ihrer unterschiedlichen pI ebenfalls voneinander trennen (Abb. 28). Neben dieser zweiten Lhca4-Isoform, wurden in den MS/MS-Experimenten zwei Peptide detektiert, die zunächst keiner der bisher in Tomate beschriebenen Lhca-Sequenzen zugeordnet werden konnten. Mittels Datenbankrecherche wurden sie jedoch als Bestandteil des Lhca5-Homologs von Tomate identifiziert (siehe Kap. D4.1.4.1). Damit wurde zum ersten Mal das Vorkommen eines Lhca5-Proteins in einer höheren Pflanze nachgewiesen.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen zur Proteinzusammensetzung der PSI-Antenne also, dass diese komplexer zusammengesetzt ist als üblicherweise angenommen.

3. Lhca5 - ein zusätzliches LHCI-Protein

Wie oben bereits beschrieben, konnte durch die in dieser Arbeit durchgeführten massenspektrometrischen Untersuchungen an Tomaten-PSI ein zusätzliches Lhca-Protein nachgewiesen werden, das eine hohe Sequenzidentität mit dem Genprodukt des von Jansson (1999) für *A. thaliana* beschriebenen *lhca5*-Gens aufweist (Abb. 23). Da das *lhca5*-Gen einen im Vergleich zu den anderen *lhca*-Genen niedrigen Expressionslevel hat (Jansson, 1999), woraus eine ebenfalls niedrigere Proteinmenge resultiert, konnte das entsprechende Protein lange Zeit nicht nachgewiesen werden. In *C. reinhardtii* wurde vor kurzem mit Hilfe von MS/MS-Analysen ein Protein entdeckt, das als Lhca5 bezeichnet wurde (Stauber et al., 2003), dessen Sequenzübereinstimmung mit dem Lhca5 höherer Pflanzen allerdings eher gering ist (Ganeteg et al., 2004).

Durch unsere Untersuchungen konnte also nicht nur nachgewiesen werden, dass in Tomate ein Lhca5-Homolog existiert (was mittlerweile auch durch EST-Datenbanksuchen bestätigt wurde, Ganeteg et al., 2004), sondern es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Lhca5 tatsächlich als Protein in einer höheren Pflanze vorkommt. Außerdem stützt die Tatsache, dass das Tomaten-Lhca5 sowohl im PSI-LHCI-Holokomplex als auch in LHCI-730, aber nicht in LHCI-680, gefunden wurde (Tab. 22, 25) die Annahme, dass es sich dabei um ein mit dem PSI assoziiertes Lhca-Protein handelt (Jansson 1999), und legt zum anderen die Vermutung nahe, dass es vermutlich mit Lhca1 und/oder Lhca4 interagieren könnte. Die Existenz des Lhca5-

Proteins in *A. thaliana* und seine Assoziation mit dem PSI-LHCI-Holokomplex wurde mittlerweile auch von Ganeteg et al (2004) mittels einer Westernblot-Studie nachgewiesen. In der gleichen Studie wurden durch Datenbankrecherche für 15 weitere höhere Pflanzen aus verschiedenen Familien EST-Sequenzen entdeckt, die für Lhca5-Homologe codieren, was darauf hindeutet, dass das Lhca5-Apoprotein generell in höheren Pflanzen exprimiert wird. Dies wird auch durch im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführte Westernblot Untersuchungen gestützt, in denen das entsprechende Protein in PSI-Präparationen aus Erbse detektiert werden konnte (Harms, 2005).

3.1 Wo beginnt das mature Lhca5-Apoprotein?

Da das native Lhca5-Apoprotein bisher noch nicht isoliert und sequenziert werden konnte bzw. in unseren MS/MS-Messungen kein einem potentiellen N-Terminus entsprechendes Peptid gefunden wurde, ist der Beginn des maturated Lhca5-Proteins noch Gegenstand von Diskussionen. Von Jansson (1999) wurde aufgrund von Sequenzhomologien postuliert, dass das mature Lhca5-Protein von *A. thaliana* mit AGGG... beginnt und damit eine Länge von 223 AS und eine Molekularmasse von 24,3 kDa hat. Überträgt man diesen Beginn auf die AS-Sequenz des Lhca5-Homologs von Tomate, so würde dieses mit ARKG.... beginnen, bestünde aus 225 AS und hätte eine Masse von 24,5 kDa (siehe Abb. 23). Dieser Beginn entspricht dem durch das Programm TargetP- vorhergesagten Proteinbeginn. Allerdings behaupten Gomez et al. (2003), dass solche Transitsequenzvorhersagen gerade bei Membranproteinen fehlerbehaftet sind. Deshalb ist es nicht überraschend, dass das Lhca5-Protein aus Tomate in 1D-Gelen in Proteinbanden mit apparenten Molekulargewichten zwischen 22300 und 23200 gefunden wurde, was auf eine geringere Größe des maturated Proteins schließen lässt. Eine geringere Größe des maturated Lhca5 wird auch durch Westernblot-Experimenten in *A. thaliana* gestützt, bei denen durch einen anti-Lhca5-AK eine Bande mit einer apparenten Molekularmasse von ~ 23 kDa detektiert wurde (Ganeteg et al., 2004). Dies veranlasste die Autoren dazu, den maturated Lhca5 von *A. thaliana* mit AVERAT.... beginnen zu lassen. Dies würde zu einem Protein mit 214 AS und 23,5 kDa führen und übertragen auf Tomate in einem mit AHQR... beginnenden 213 AS langen und 23,2 kDa schweren Protein resultieren. In den in Kap. D4.3 beschriebenen massenspektrometrischen Molekulargewichtsbestimmungen solubilisierter LHCI-Proteine wurden jedoch nur unbekannte Massen zwischen 22,3 und 22,6 kDa gefunden (Tab. 25). Verkürzt man den Lhca5 von Tomate auf 206 AS, was bedeuten würde, dass er mit LPGLD... beginnt, so stimmt das theoretische Molekulargewicht (22325,92) sehr gut mit einer der gemessenen Massen (22325,8 Da) überein.

Schlussendlich kann weder über den tatsächlichen Beginn des maturated Lhca5 von Tomate noch über den des maturated Lhca5 von *A. thaliana* eine abschließende Aussage gemacht werden. Dazu müsste das native Protein isoliert und N-terminal ansequenziert werden, oder zumindest so weit aufgereinigt und aufkonzentriert werden, dass MS-Messungen oder MS/MS-Messungen eindeutige Ergebnisse liefern.

3.2 Lhca5 ist ein funktionelles Lichtsammelprotein

Nachdem die Existenz des Lhca5-Apoproteins *in vivo* eindeutig geklärt war, stellte sich die Frage, ob dieses Protein in der Lage ist einen funktionellen LHC zu bilden, und damit als zusätzliches Lichtsammelprotein bezeichnet werden kann. Dazu sollten in dieser Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

- Ist Lhca5 in der Lage spezifisch Pigmente zu binden?
- Führt die Pigmentbindung dazu, dass der Energietransfer von Chl *b* nach Chl *a* etabliert wird?
- Welche Pigmente sind essentiell für die Bildung stabiler Pigment-Protein-Komplexe?
- Interagiert Lhca5 mit einem der anderen Lhca-Proteine?

Bisher ist es noch nicht gelungen einen nativen Lhca5-Pigment-Protein-Komplex zu isolieren. Dies liegt an der geringen Menge mit der dieser LHC sowohl in Thylakoiden als auch in PSI-Präparationen vorkommt (Ganeteg et al., 2004). Deshalb wurde zur Beantwortung dieser Fragen auf die Detergenswechsellmethode zurückgegriffen, mit der *in vitro* aus überexprimierten Lhc-Apoproteinen und isolierten Pigmenten LHC rekonstituiert werden können (Kap. C2.4). Es wurde für viele andere Lhc-Proteine beschrieben, dass diese Methode zur Bildung von LHC führt, deren biochemische und spektroskopische Eigenschaften denen entsprechender nativer LHC gleichen (z.B. Paulsen et al., 1993; Pagano et al., 1998; Schmid et al., 2002).

Zur Rekonstitution wurden drei verschiedene rekombinante Lhca5-Apoproteine verwendet (Kap. D5.2). Dabei handelt es sich um das Vorläuferprotein des Lhca5 von *A. thaliana*, den maturen Lhca5 aus *A. thaliana* mit dem in Jansson (1999) postulierten N-Terminus, und das Vorläuferprotein des in der vorliegenden Arbeit entdeckten Lhca5-Homologs aus Tomate (Abb. 23). Das mature Lhca5-Protein von Tomate liess sich trotz Änderungen am N-Terminus nicht überexprimieren (Kap. D5.1.1), so dass es zur Rekonstitution nicht zu Verfügung stand. Ähnliche Schwierigkeiten bereitete auch die Überexpression von Lhca2, bei dem erst größere Veränderungen des N-Terminus und Veränderungen der Anzuchtbedingungen zur erfolgreichen Überexpression führten (Bergauer, 2000; Wiener, 2000; Potthast, 2002). Für diese Experimente blieb im Rahmen meiner Arbeit jedoch keine Zeit mehr.

Wie in Abb. 31 zu sehen ist, führt die Auftrennung der rekonstituierten Lhca5-Proteine in schwach denaturierenden Gelen zur Ausbildung einer pigmentierten LHC-Bande, die mit den Monomerbanden von r-Lhca1 bis r-Lhca4 komigrierte. Eine mit dem Lhca1/Lhca4-Dimer vergleichbare Bande konnte nicht beobachtet werden. Daraus lässt sich schließen, dass Lhca5 zwar Pigmente bindet und zu stabilen LHC-Monomeren assembliert, dass es jedoch keine Homodimere bilden kann. Dabei scheint der N-Terminus keine essentielle Rolle bei der Komplexassemblierung zu spielen, da die Rekonstitution der beiden Vorläufer-Lhca5 und des maturen *A. thaliana*-Lhca5 ähnliche LHC-Ausbeuten ergaben. Dies wurde auch schon für das Vorläuferprotein und das mature Protein des Lhcb1 beobachtet (H. Paulsen, pers. Mitteilung)

Rekonstituierter Lhca5 ist ein funktioneller Lichtsammelkomplex

Durch die Aufnahme von Fluoreszenzanregungs- und -emissionsspektren konnte nachgewiesen werden, dass nach der Rekonstitution die Energieübertragung von Chl *b* nach Chl *a* etabliert ist, und Lhca5 somit einen funktionellen Lichtsammler bildet. Das Emissionsspektrum von r-Lhca5

mit einem Maximum bei 684 nm ähnelt dem von r-Lhca1 (Schmid et al., 1997; Croce et al., 2002a) und r-Lhca2 (Schmid et al., 2002a; Castelletti et al., 2003), die ebenfalls ein einziges Maximum bei 684 bzw. 688 nm aufweisen. Im Gegensatz zu r-Lhca2 besitzt r-Lhca5 keine in den langwelligen Bereich reichende Schulter. Genau so wenig ist ein langwelliger Fluoreszenzpeak wie er für r-Lhca3 und r-Lhca4 beschrieben wurde vorhanden (Croce et al., 2002a; Schmid et al., 2002a; Castelletti et al., 2003). Es wurde nachgewiesen, dass das Vorkommen dieser langwelligen Fluoreszenz dadurch bedingt wird, dass der Chl-Ligand an Position A5 (Nomenklatur nach Kühlbrandt et al., 1994) bei Lhca3 und Lhca4 ein Asparagin ist (Schmid et al., 2002a; Keuchel et al., 2003; Morosinotto et al., 2003), während sich in allen anderen Lhc-Proteinen, inklusive Lhca5, an dieser Stelle ein Histidin befindet (siehe auch Abb. 23). Daher wäre das Auftreten einer langwelligen Fluoreszenz für Lhca5 überraschend gewesen. Die Lhca5-Fluoreszenzdaten passen zu Raumtemperaturmessungen an *A. thaliana*-Lhca5-„knockout“-Pflanzen, die zeigen, dass sich Wildtyp- und Δ Lhca5-Pflanzen in ihren Fluoreszenzeigenschaften nicht unterscheiden, weder wenn man PSI-Präparationen noch ganze Blätter vermisst (Ganeteg et al., 2004). Daraus lässt sich schließen, dass Lhca5 entweder keine auffälligen Fluoreszenzeigenschaften besitzt, oder dass sein Beitrag zur Gesamtfluoreszenz so gering ist, dass dieser nicht zu detektieren ist. Das gleiche gilt für die Fluoreszenz des später noch genauer beschriebenen Lhca1/Lhca5-Dimers, die sich nicht signifikant von dem der entsprechenden Monomere unterscheidet.

Die Pigmentbindung von Lhca5 ist spezifisch

Aus dem in Abb. 33 dargestellten Vergleich der von r-Lhca5 gebundenen Pigmente mit dem zur Rekonstitution verwendeten Totalextrakt wird ersichtlich, dass Lhca5 Pigmente in einer spezifischen Zusammensetzung bindet, die aber partiell Ähnlichkeiten mit den Pigmentbindungseigenschaften anderer Lhc-Proteine aufweist (Tab. 4, 29).

So ist das Chl *a/b*-Verhältnis von r-Lhca5 mit 2,6 identisch oder zumindest vergleichbar mit dem von r-Lhca4 (2,6), r-Lhca2 (2,3) und r-Lhcb5 (2,2), während r-Lhcb1 und r-Lhcb6 ein wesentlich niedrigeres Chl *a/b*-Verhältnis von 1,4 aufweisen. Das Chl *a/b*-Verhältnis von r-Lhcb4, r-Lhca1 und r-Lhca3 ist mit 3,0, 3,5 und 6,1 dagegen deutlich höher als das von r-Lhca5.

Tab. 29: Pigmentzusammensetzung von r-Lhca1 bis r-Lhca5. Es handelt sich um Daten von mit Gesamtpigmentextrakt rekonstituierten Lhca1-4 von Tomate und Lhca5 von *A. thaliana*. Die Daten für Lhca1-4 entsprechen den in Schmid et al. (2002) veröffentlichten Werten normiert auf 12 Chl. Die Werte für Lhca5 entstammen dieser Arbeit (Abb. 33).

	Lhca1	Lhca2	Lhca3	Lhca4	Lhca5
Neoxanthin	0,34 ± 0,14	0,12 ± 0,03	0,36 ± 0,05	0,14 ± 0,04	0,35 ± 0,05
Lutein	1,71 ± 0,15	1,67 ± 0,05	2,23 ± 0,13	1,56 ± 0,08	1,89 ± 0,17
Violaxanthin	0,30 ± 0,05	0,22 ± 0,04	0,31 ± 0,02	0,20 ± 0,03	0,28 ± 0,04
β-Carotin	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,20 ± 0,05	0,05 ± 0,02	0,18 ± 0,10
Gesamtchlorophyll	12	12	12	12	12
Chl <i>a/b</i>	3,48 ± 0,16	2,28 ± 0,05	6,14 ± 0,07	2,59 ± 0,41	2,57 ± 0,32
Gesamtcarotinoide	2,41 ± 0,3	2,06 ± 0,07	3,10 ± 0,07	1,96 ± 0,13	2,7 ± 0,22

Die verschiedenen Lhca-Proteine unterscheiden sich allerdings nicht nur in dem Verhältnis, in dem sie die beiden Chl-Spezies ligieren, sondern wie bereits erwähnt auch in der gebundenen Carotinoidmenge und -Zusammensetzung. So enthalten r-Lhca2 und r-Lhca4 insgesamt nur zwei, r-Lhca3 insgesamt jedoch drei Car (Tab. 29). Und ob Lhca1 zwei oder drei Carotinoide ligieren kann, ist noch Gegenstand von Diskussionen (siehe Kap. E1.2). In der Kristallstruktur von LHCIIb wurden insgesamt sogar vier Carotinoide aufgelöst (Liu et al., 2004). Die Pigmentdaten für r-Lhca5 ergeben einen Carotinoidgehalt von 2,7, d.h. es ist davon auszugehen, dass das Lhca5-Apoprotein wie r-Lhca3 drei Carotinoide bindet. Ganeteg et al. (2004) schlagen vor, dass Lhca5 eine Rolle beim Schutz des PSI vor photooxidativer Schädigung spielt, da die Lhca5-mRNA im Gegensatz zu der anderer Lhca unter Starklicht hochreguliert wird. Möglicherweise könnte ein hoher Carotinoidgehalt dieser Funktion zu Gute kommen. In dieser Hinsicht wäre es interessant auch mit r-Lhca5 *in vitro*-Deepoxidationsstudien durchzuführen, um zu sehen wie gut sich das im r-Lhca5 gebundene Vio im Vergleich mit den anderen r-Lhca deepoxidieren lässt. Möglicherweise liesen sich daraus weitere Rückschlüsse auf die Funktion dieses neuen LHC ziehen.

Betrachtet man die Stöchiometrie der gebundenen Car so fällt auf, dass in Lhca5 wie in allen Lhca-Proteinen Lut das am häufigsten vorkommende Xanthophyll ist. Lhca5 bindet 1,9 Lut-Molekülen pro 12 Chl. Das ist vergleichbar mit den 1,6-2,2 Lut-Molekülen, die in den anderen r-Lhca entdeckt wurden (Tab. 28, 29) und stimmt mit der Kristallstruktur von LHCIIb überein, in der zwei Lut aufgelöst wurden (Liu et al., 2004). Vio wird von r-Lhca5 in der gleichen substöchiometrischen Menge (0,3) ligiert wie von den anderen r-Lhca-Proteinen (0,2-0,3; Tab. 29). Außerdem ligiert Lhca5 ebenso wie die anderen r-Lhca substöchiometrische Mengen an Neo (0,34), einem Xanthophyll das in nativem LHCI nicht enthalten ist (siehe auch Kap. E1.1).

Fasst man die Pigmentdaten für r-Lhca5 zusammen, so bindet das Lhca5-Apoprotein Pigmente in einer spezifischen Stöchiometrie, wobei die Anzahl der gebundenen Carotinoide und ihre Stöchiometrie der von Lhca3 und der Chl-Gehalt dem von Lhca4 ähneln.

Lhca5 benötigt Chl *b* zur Bildung stabiler Pigment-Protein-Komplexe

Für die Antennenproteine des PSII (Lhcb4, Lhcb5 und Lhcb1) sowie für die Proteine des LHCI konnte nachgewiesen werden, dass es vom Chl *a/b*-Verhältnis des fertigen LHC abhängt, welche Chl-Spezies für die Rekonstitution absolut notwendig ist (Paulsen et al., 1990; Giuffra et al., 1996; Ros et al., 1998; Schmid et al., 1998; Schmid et al., 2002a). LHC mit einem relativ hohen Chl *b*-Anteil (Lhcb1, Lhcb5, Lhca2 und Lhca4) benötigen Chl *b* im Rekonstitutionsansatz, können jedoch ohne Chl *a* rekonstituiert werden und LHC mit hohem Chl *a*-Anteil (Lhcb4, Lhca1 und Lhca3) haben den entgegengesetzten Chl-Bedarf.

Lhca5 fügt sich in das beschriebene Muster ein. Er weist ein relativ niedriges Chl *a/b*-Verhältnis auf, enthält also relativ viel Chl *b*, und bildet keine stabilen LHC, wenn Chl *b* im Rekonstitutionsansatz fehlt. Im Gegensatz dazu können Chl *a* oder einzelne Carotinoide (Lut, Vio, Neo) im Rekonstitutionsansatz fehlen, ohne dass dies Auswirkungen auf die Bildung oder die Stabilität der gebildeten LHC hätte. Damit ist der Pigmentbedarf von Lhca5 insgesamt vergleichbar mit dem von Lhca2 (Schmid et al., 2002a). Beide Proteine können auch ohne Lut stabile LHC bilden, wohingegen das Fehlen von Lut bei Lhca1, Lhca3 und Lhca4 zu einer stark verringerten LHC-Ausbeute bzw. instabileren LHC führt (Schmid et al., 2002a). Was den

Carotinoidbedarf angeht gleichen Lhca2 und Lhca5 demnach Lhcb1, bei dessen Rekonstitution Lutein ebenfalls durch andere Carotinoide ersetzt werden kann (Hobe et al., 2000; Jahns et al., 2001).

4. Oligomerisierungsverhalten von LHCI-Proteine

Eine weitere Eigenschaft, in der sich die verschiedenen Mitglieder der Lhc-Proteinfamilie unterscheiden, ist ihre Fähigkeit zur Bildung von Oligomeren. Während LHCIIb *in vivo* als gemischtes Trimer aus Lhcb1-3 vorliegt (Jackowski et al., 2001), bilden die minoren LHCII (Lhcb4-6) lediglich Monomere (Dainese und Bassi, 1991). Von den LHCI-Proteinen ist bekannt, dass Lhca1 und Lhca4 ein stabiles Heterodimer bilden, das auch als solches isoliert bzw. *in vitro* nachgebildet werden kann (Schmid et al., 1997).

4.1 Lhca5 interagiert mit Lhca1

Die mit Lhca5 durchgeführten Dimerisierungsexperimente führten zu einem interessanten Ergebnis. Wenn Lhca5 alleine oder in Gegenwart von Lhca2, Lhca3 oder Lhca4 rekonstituiert wurde, konnte in schwach denaturierenden Gelen und Saccharosedichtegradienten (SDG) lediglich eine grüne Bande auf Höhe der Monomerbanden der anderen Lhca-Proteine aufgetrennt werden (Abb. 31, 35). Daraus lässt sich schließen, dass r-Lhca5 weder stabile Homodimere bildet, noch mit den genannten Proteinen Heterodimere formt. Rekonstituiert man jedoch Lhca5 zusammen mit Lhca1 so sind neben der FP-Bande zwei Banden zu beobachten, von denen die untere zwar niedriger läuft als die Monomerbanden der anderen r-Lhca, allerdings nicht mit der Lhca1/Lhca4-Dimerbande kosedimentiert. Diese Bande enthält Lhca1 und Lhca5 in nahezu äquimolaren Mengen, woran sich auch nichts ändert, wenn das Lhca1/Lhca5-Apoproteinverhältnis im Rekonstitutionsansatz stark verändert wird (Abb. 36). Die Proteinzusammensetzung der oberen Bande entspricht dagegen stets dem im Rekonstitutionsansatz enthaltenen Lhca1/Lhca5-Verhältnis. Das konstante Proteinverhältnis in der unteren Bande lässt darauf schließen, dass sie durch eine Interaktion zwischen Lhca1 und Lhca5 entsteht, also ein Lhca1/Lhca5-Heterodimer darstellt.

Im Vergleich zu dem Lhca1/Lhca4-Dimer scheint das Lhca1/Lhca5-Dimer allerdings eine weniger kompakte Struktur anzunehmen, woraus eine weniger hohe Dichte resultiert, durch die sich das unterschiedliche Laufverhalten der beiden Dimere im SDG erklären lässt. Für eine weniger kompakte Faltung des Lhca1/Lhca5-Dimers spricht auch die Tatsache, dass sich die Fluoreszenzemission des Dimers nicht von der Fluoreszenzemission der beiden Monomere unterscheidet (Abb. 37). Im Gegensatz dazu verschiebt sich bei der Dimerisierung von Lhca1 und Lhca4 das Fluoreszenzmaximum deutlich hin zu längeren Wellenlängen (Schmid et al., 1997; Croce et al., 2002a), was auf eine durch die enge Interaktion der beiden Monomere induzierte Pigmentumordnung zurückgeführt wird. Dies würde bedeuten, dass die Interaktion von Lhca1 und Lhca5 weniger stark ist, und keine Umordnung der Chromophore bewirkt. Auch das fehlende Auftreten von Lhca1/Lhca5 Dimeren in schwach denaturierenden Gelen (Abb. 35) lässt auf eine geringere Stabilität des Lhca1/Lhca5-Dimers im Vergleich zum Lhca1/Lhca4-Dimer schließen.

Die *in vitro*-Interaktion von Lhca5 mit Lhca1 ist ein weiteres Indiz dafür, dass es sich bei Lhca5 um einen LHC des PSI handelt. Nachdem im Vergleich mit den übrigen Lhca-Proteinen Lhca5 mit 47% die größte Sequenzidentität mit Lhca4, dem normalen Interaktionspartner von Lhca1, aufweist, erscheint eine Interaktion zwischen Lhca1 und Lhca5 auch am ehesten plausibel. Außerdem wird in Δ Lhca4 Pflanzen von *A. thaliana* die Lhca5-Proteinmenge hochreguliert, was bedeuten könnte, dass Lhca4 unter bestimmten Umweltbedingungen durch Lhca5 ersetzt werden kann (Ganeteg et al., 2004). Allerdings ist in diesen Pflanzen auch die Lhca1-Proteinmenge reduziert, was darauf hindeutet, dass Lhca4 *in vivo* für die Stabilität von Lhca1 notwendig ist, und eben nicht vollständig durch Lhca5 ersetzt werden kann. Außerdem zeigen Analysen von Δ Lhca2 und Δ Lhca3-Pflanzen, dass der Lhca5-Proteingehalt mit dem Gehalt an Lhca2 korreliert, was eher darauf hindeutet, dass die Bindung von Lhca5 an PSI durch Lhca2 stabilisiert wird und nicht durch Lhca1, dessen Menge in beiden Pflanzen dem im Wildtyp entspricht (Ganeteg et al., 2004). Einer Interaktion von Lhca5 mit Lhca2 oder Lhca3 widersprechen allerdings die in dieser Arbeit durchgeführten MS/MS-Messungen (Tab. 22), da durch diese Lhca5 zwar in LHCI-730-Präparationen, aber nicht in LHCI-680-Präparationen nachgewiesen werden konnte, was wiederum die *in vitro* gefundene Interaktion zwischen Lhca1 und Lhca5 nahelegt.

Im Hinblick auf die Funktion von Lhca5 wäre es sinnvoll nicht nur wie in Kap. E3.2 vorgeschlagen mit Lhca5-Monomeren, sondern auch mit Lhca1/Lhca5-Dimeren *in vitro*-Deepoxidationsexperimente durchzuführen, um zu sehen, ob sich die Deepoxidierbarkeit des gebundenen Vio im Zuge der Dimerisierung verändert. Dabei wäre es interessant parallel Experimente mit dem Lhca1/Lhca4-Dimer durchzuführen, so dass man aus eventuellen Unterschieden zwischen den beiden Lhca1-Heterodimeren Rückschlüsse auf die unterschiedliche Funktion von Lhca4 und Lhca5 ziehen könnte. In diesem Zusammenhang wäre auch die Durchführung von zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen wie sie von Melkozernov et al. (1998) für das Lhca1/Lhca4-Dimer bereits vorgenommen wurden interessant, um zu ermitteln ob die Effizienz der Energieweiterleitung unterschiedlich ist, je nachdem ob Lhca1 mit Lhca4 oder Lhca5 interagiert.

4.2 Bilden Lhca2 und Lhca3 Dimere?

Der Oligomerisierungsgrad von Lhca2 und Lhca3 *in vivo* ist noch nicht geklärt. Es gibt sowohl Hinweise, die für die Formation von Homodimeren sprechen (Knoetzel et al., 1992; Jansson et al., 1996) als auch solche, die eher auf die Bildung von Heterodimeren hindeuten (Ganeteg et al., 2001; Croce et al., 2002a). Nimmt man die Kristallstruktur des PSI von Erbse als Grundlage, in der nur vier LHCI-Monomere pro PSI-Core aufgelöst sind, und kombiniert sie mit Daten aus Proteinanalysen des PSI, in denen die LHCI-Apoproteine in der Regel in nahezu gleichen Mengen auftreten (Ballottari et al., 2004), so erscheint die Bildung eines Lhca2/Lhca3-Heterodimers als wahrscheinlichstes Szenario.

Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Experimente zur Dimerisierung von Lhca2 und Lhca3 führten allerdings nicht zur Bildung von Dimeren. Auch durch den Zusatz von Lipiden, und speziell PG, das für die Trimerisierung des majoren LHCII essentiell ist (Remy et al., 1982, Nußberger et al., 1993) und auch bei der Dimerisierung von Lhca1 und Lhca4 eine Rolle spielt

(Schmid et al., 1998), konnte die Bildung von Lhca2/Lhca3-Dimeren nicht induziert werden (Abb. 16, 17). Genau so wenig konnte die Lhca2/Lhca3-Dimerisierung durch zweiwertige Kationen vermittelt oder stabilisiert werden (Abb. 18). Ähnliche von Castelletti et al. (2003) durchgeführte Versuche mit r-Lhca2 und r-Lhca3 von *A. thaliana* führten ebenfalls nicht zur Bildung von Lhca2/Lhca3-Dimeren. Für eine Interaktion von Lhca2 und Lhca3 *in vivo* sprechen zum einen spektroskopische Befunde, die in PSI-LHCI-Präparationen Hinweise für das Auftreten zweier unterschiedlicher Dimere erbrachten (Ihalainen et al., 2000) und Analysen von *A. thaliana* Lhca2- bzw. Lhca3-Antisense-Pflanzen, die zeigten, dass wenn eines der beiden Proteine fehlt, auch die Menge des anderen Proteins stark reduziert ist (Ganeteg et al., 2001). Allerdings muss die Interaktion zwischen Lhca2 und Lhca3 schwächer sein als im Fall von Lhca1 und Lhca4, da unter Isolations-Bedingungen, bei denen das Lhca1/Lhca4-Dimer (LHCI-730) stabil bleibt, Lhca2 und Lhca3 nur als Monomere isoliert werden können, entweder als Lhca2/Lhca3-Mischfraktion (LHCI-680, siehe Kap.21D1.1) oder als Fraktionen, in denen jeweils eines der beiden Proteine angereichert ist (Knoetzel et al., 1992). Das Fehlschlagen der Bildung von Lhca2/Lhca3-Dimeren oder den entsprechenden Homodimeren *in vitro* könnte zum einen ebenfalls mit einer schwachen Interaktion zwischen den LHCI-680-Proteinen erklärt werden, die dazu führt, dass gebildete Dimere selbst während der relativ schonenden Aufreinigung über SDG-UZ zerfallen. Es ist aber auch denkbar, dass an der Dimerisierung eine bisher unbekannte Komponente beteiligt ist, oder dass Lhca2 und Lhca3 möglicherweise erst interagieren, wenn beide an den PSI-Holokomplex gebunden sind. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass Lhca3 erst durch die Bindung an eine PSI-Kernuntereinheit z.B. PSI-K, für das von verschiedenen Autoren eine Interaktion mit Lhca3 bereits beschrieben wurde (Jensen et al., 2000, Mosley et al., 2002), so stabilisiert wird, dass eine Interaktion möglich ist.

Das Auftreten von zwei Monomerbanden in SDG (Abb. 16B, 18B), deren Proteinzusammensetzung sich durch Zugabe von Lipiden oder Ionen verändert (Abb. 16C, 19) deutet darauf hin, dass beide LHCI-680-Proteine in zwei Konformationen vorkommen können, die sich durch ihre Dichte unterscheiden. Dabei scheint r-Lhca3 allerdings instabiler zu sein als r-Lhca2, da sowohl bei Erhöhung der Ionenkonzentration als auch der Lipidmenge Lhca3 zunächst aus der unteren Bande verschwindet (zu erklären dadurch, dass die Faltung des LHC „aufgelockert“ wird) und letztendlich auch in der oberen Bande nicht mehr vorhanden ist, was bedeutet, dass der Pigment-Protein-Komplex zerfallen ist. Die Menge an Lhca2 bleibt dagegen relativ konstant, lediglich bei der Zugabe von 30 mM CaCl₂ nimmt die Menge an Lhca2 in der oberen Bande ab, was allerdings eher auf eine Stabilisierung (kompaktere Faltung) und nicht auf einen beginnenden Zerfall hindeutet. Auch die *in vitro*-Deepoxidationsexperimente deuten darauf hin, dass r-Lhca3 weniger stabil ist als die anderen r-Lhca. Nach nochmaliger SDG-UZ des Deepoxidationsansatzes befinden sich bei r-Lhca3 etwa zwei Drittel der Pigmente in der FP-Bande, während diese bei den anderen r-Lhca weniger als 20% ausmachte (Tab. 20). Möglicherweise liegt die fehlende Interaktion *in vitro* deshalb auch an der Instabilität des r-Lhca3.

Eine Möglichkeit den Oligomerisierungsgrad von Lhca2 und Lhca3 doch noch zu klären bestünde darin, sowohl für die Isolierung von nativem LHCI als auch für die Aufreinigung von Rekonstitutionsansätzen über SDG-UZ Gradienten andere, möglicherweise schonendere Detergenzien zu verwenden (z.B. α -Dodecylmaltosid). Außerdem wäre es rückblickend sinnvoll

gewesen, die bei der Lhca1/Lhca5-Dimerisierung durchgeführten Experimente mit variierenden Apoproteinverhältnissen auch mit Lhca2 und Lhca3 durchzuführen. Allerdings sollte dazu zuvor sichergestellt werden, dass die Stabilität der verwendeten r-LHC nicht zu sehr voneinander abweicht. Dafür wäre es sinnvoll zu klären, ob r-Lhca3 wirklich weniger stabil ist als die anderen r-Lhca, und wenn dem so ist, zu untersuchen woran das liegt.

5. Bedeutung der beobachteten Lhca-Proteinvierfalt für die Struktur und Funktion des PSI-LHCI-Holokomplexes

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei Lhca5 um einen funktionellen LHC des PSI handelt (Kap. E3.2), und dass in Tomate eine zweite Isoform des Lhca4 vorkommt (Kap. D4.1.4.2). Außerdem wurde auch in anderen Studien das Auftreten von zusätzlichen Lhca-Isoformen im PSI höherer Pflanzen beschrieben, darunter Isoformen von Lhca1 und Lhca2 in Tomate (Zolla et al., 2002; Huber et al., 2004). Und es gibt neue Hinweise darauf, dass auch Lhca6 auf Proteinebene vorkommt (S. Jansson, persönliche Mitteilung). Deshalb stellt sich die Frage, wie das Vorkommen von mindestens sechs Lhca-Apoproteinen in Tomate (und anderen höheren Pflanzen) mit nur vier in der PSI-Struktur aufgelösten LHCI-Monomeren in Einklang zu bringen ist. Wobei nochmals anzumerken ist, dass Lhca5 nicht nur in *A. thaliana* und Tomate, sondern auch in Erbse (Harms, 2005) auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte, und entsprechende EST-Klone für viele verschiedene höhere Pflanzen beschrieben wurden (Ganeteg et al., 2004).

In mehreren Studien mit *A. thaliana*-Mutanten und mit unter verschiedenen Umweltbedingungen angezogenen Pflanzen bereits nachgewiesen, dass die Proteinzusammensetzung und die Größe der PSI-Antenne variabel sind (Kap. A2.3). So kann z.B. im Rahmen der „state-transition“ unter state2-Bedingungen ein Teil des LHCII an das PSI angelagert werden (Allen und Forsberg, 2001; Haldrup et al., 2001). Desweiteren wurde beobachtet, dass in Abhängigkeit von der Lichtintensität unterschiedliche Mengen an Lhca1 und Lhca4 vorhanden sind (Bailey et al., 2001), und für Grana- und Stromathylakoide wurden PSI-Populationen mit unterschiedlich großer Antenne beschrieben (Jansson et al., 1997). Für die Interaktion von Lhca5 oder anderer zusätzlicher LHC-Monomere mit dem PSI-LHCI-Holokomplex kämen also zwei unterschiedliche Möglichkeiten in Betracht. Diese sind in Abb. 40 schematisch dargestellt.

Nimmt man an, dass am PSI-Kernkomplex grundsätzlich nur vier LHC-Monomere gebunden sein können, so wäre möglich, dass in unterschiedlichen PSI-Populationen, wie sie z.B. für Grana- und Stromathylakoide beschrieben wurden (Svensson et al., 1991), die „normalen“ Lhca-Proteine (also Lhca1-4) teilweise durch „neue“ Proteine ausgetauscht werden können. Wenn man davon ausgeht, dass Lhca5 auch *in vivo* mit Lhca1 interagiert, würde dies bedeuten, dass Lhca4 unter bestimmten Bedingungen durch Lhca5 ersetzt werden kann. Dies könnte z.B. unter Starklichtbedingungen der Fall sein, wenn Lhca5 im Vergleich zu den anderen Lhca-Proteinen hochreguliert wird (Ganeteg et al., 2004). Genauso käme ein Austausch der beiden Lhca4-Isoformen in Betracht, wobei noch zu klären ist, in wie weit die LHC der beiden Isoformen sich unterscheiden.

Ben-Shem et al. (2004) schlagen vor, dass die Bindung der einzelnen LHC an den PSI-Kern hinsichtlich der Energieübertragung optimiert ist. Eine optimale Energieweiterleitung findet demnach nur statt, wenn das „richtige“ LHC-Monomer an der „richtigen“ Bindungsstelle sitzt, so dass die Chl des LHC-Monomers und die zwischen dem LHCI und dem PSI-Kern gelegenen „gap“-Chl die richtige Position zueinander haben. Der Austausch eines LHC-Monomers gegen ein anderes würde damit zu einer schlechteren Energieweiterleitung zwischen LHCI und PSI-Kern führen. Hätte der „falsche“ LHC dann auch noch größere Kapazitäten zur Wärme-dissipation überschüssiger Energie, wäre dieser Austausch ein Schutz vor zu hoher Licht-einstrahlung.

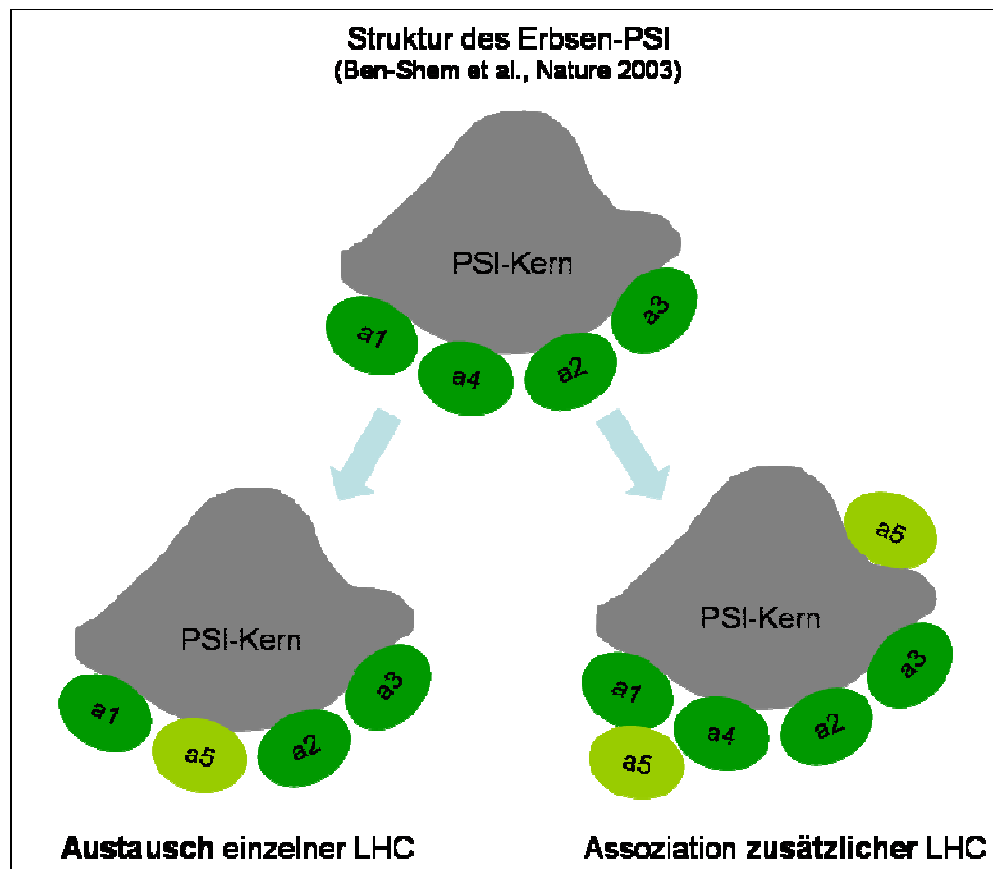


Abb. 40: Modelle für die Interaktion zusätzlicher LHCI-Monomere mit dem PSI-Kern. Adaptiert nach V. Schmid. Als Grundlage dienen die Struktur des PSI aus Erbse (Ben-Shem et al., 2003) und Annahmen über die Struktur des PSI von *Chlamydomonas* (Dekker und Horton, 2005). Die Modelle werden im Text beschrieben. Als Beispiel eines zusätzlichen LHC-Monomers dient der in dieser Arbeit charakterisierte Lhca5 (siehe Kap. E3). A1-a5, Lhca1-Lhca5.

Im Gegensatz zu dem ersten Modell, das von einer konstanten Anzahl von LHCI-Monomeren pro PSI-Kern ausgeht, könnten aber auch zusätzliche LHC-Monomere an den PSI-LHCI-Holokomplex gebunden werden, was zu PSI-Populationen mit differierender Antennengröße führen würde. Eine effektive Energieweiterleitung zwischen „zusätzlichen“ LHC-Monomeren und dem „regulären“ LHCI bzw. dem PSI-Kern vorausgesetzt, würde dadurch die Anregungswahrscheinlichkeit des RZ erhöht und nicht wie im oben beschriebenen Szenario verringert. Die zusätzlichen LHC-Monomere könnten zum einen direkt an PSI-Kernuntereinheiten binden,

oder aber indirekt über Interaktionen mit den vier "Standard"-LHCI mit dem PSI-LHCI-Holokomplex assoziieren. In beiden Fällen wäre zu erwarten, dass die zusätzlichen LHC-Monomere weniger fest ligiert werden, so dass durch schnelles Andocken und Ablösen eine Anpassung an wechselnde Lichtbedingungen gewährleistet werden kann. Dies würde allerdings auch bedeuten, dass diese LHC während des Isolationsprozesses leichter „verloren“ gehen könnten, was wiederum erklären würde warum in PSI-Präparationen in der Regel immer die gleichen vier Lhca-Proteine in annähernd konstanter Stöchiometrie gefunden werden (Ballottari et al., 2004), und warum in der Kristallstruktur nur vier LHCI-Monomere vorhanden sind (Ben-Shem et al., 2003). Für diese Theorie spricht auch, dass der relative Gehalt an Lhca5 in Thylakoiden höher ist als in daraus isoliertem PSI, und dass die Lhca5-Menge von PSI-Präparation zu PSI-Präparation variiert (Ganeteg et al., 2004). Außerdem würde das auch erklären warum die in dieser Arbeit beobachtete Interaktion von Lhca5 mit Lhca1 schwächer ist als die zwischen Lhca1 und Lhca4 (Kap. E4.1).

Aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen des PSI-LHCI-Holokomplex von *C. reinhardtii*, der wesentlich größer ist als der höherer Pflanzen (Kargul et al., 2003), wird auf das Auftreten einer solchen zusätzlichen LHCI-Population geschlossen, die sozusagen in zweiter Reihe an das PSI andockt (Dekker und Boekema, 2005). Möglicherweise existiert diese zweite Reihe auch in höheren Pflanzen, nur dass hier die Interaktionen schwächer sind und deshalb in der Regel nach der PSI-Isolation nur die vier „fest“ gebundenen LHCI-Proteine gefunden werden. Neben dieser indirekten Assoziation über andere LHC-Monomere wird von Dekker und Boekema (2005) für *C. reinhardtii* auch eine zusätzliche direkte LHC-Bindungsstelle zwischen den PSI-A-, PSI-K- und PSI-L-Untereinheiten beschrieben, und die Autoren behaupten, dass auch in der Struktur des PSI höherer Pflanzen (Ben-Shem et al., 2003) an dieser Position „Platz“ für die direkte Bindung eines zusätzlichen LHC-Monomers an den PSI-Kern ist. Dies entspräche damit der oben erwähnten „direkten“ Bindung zusätzlicher LHC-Monomere an den PSI-Kern.

Abgesehen davon ob und wie zusätzliche LHC-Monomere an das PSI binden, lässt sich aufgrund der Ergebnisse der Pigmentbindungsuntersuchungen (siehe Kap. E1) auch darüber spekulieren, warum es überhaupt unterschiedliche Lhca-Proteine gibt.

Fasst man diese Ergebnisse zusammen so fällt auf, dass die beiden Lhca-Proteine, die in einem LHCI-Subkomplex enthalten sind, jeweils unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. So besitzt jeweils eines der LHC-Monomere (Lhca1 bzw. Lhca3) ein relativ hohes, das andere (Lhca2 bzw. Lhca4) ein relativ niedriges Chl *a/b*-Verhältnis, so dass bei einem Mangel an einer der beiden Chl-Arten nicht alle LHCI-Monomere gleichstark betroffen sind. Außerdem ist jeweils ein LHC mit langwellig fluoreszierenden Chl enthalten, dessen Vio zudem relativ gut deepoxidiert werden kann (Lhca3 und Lhca4), und der somit möglicherweise eine Rolle bei der Energieweiterleitung an den PSI-Kern und der Photoprotektion übernimmt. Dagegen weist das andere LHC-Monomere einer LHCI-Subfraktion keine oder nur eine geringe langwellige Fluoreszenz auf, und nur ein kleiner Teil des darin gebundenen Vio kann deepoxidiert werden (Lhca1 und Lhca2). Außerdem ist jeweils ein LHC-Monomer mit drei (Lhca1 und Lhca3) und eines mit zwei Carotinoiden enthalten (Lhca2 und Lhca4), wobei das dritte Carotinoid wohl in unterschiedliche Bindungsstellen gebunden wird und die Menge der gebundenen Carotinoide nichts über die Stabilität des jeweiligen LHC aussagt. So scheinen Lhca4 mit zwei Carotinoiden

und Lhca3 mit drei Carotinoiden beide instabiler zu sein, als Lhca1 mit drei Carotinoiden und Lhca2 mit zwei Carotinoiden. Castelletti et al. (2003) vermuten, dass diese Instabilität von einer aufgelockerten Konformation herrührt, die wiederum für die Ausbildung der zur langwelligen Fluoreszenz führenden Pigmentinteraktion nötig ist.

Auffällig ist weiterhin, dass in keinem der Lhca-Proteine die Ausprägung und Kombination der untersuchten Parameter (Chl-Präferenz, Carotinoidgehalt, Fluoreszenz und Deepoxidierbarkeit) identisch mit der Ausprägung und Kombination in einem der anderen Lhca-Proteine ist. Man könnte sich deshalb vorstellen, dass die unterschiedliche Kombination dieser Merkmale bei jedem der vier LHCI-Monomere dazu führt, dass schon durch leichte Veränderungen der LHCI-Proteinzusammensetzungen eine Reaktion auf sich ändernde Lichtbedingungen geschaffen werden kann, was wiederum zu dem zu Beginn dieses Abschnitts beschriebenen Modell passt, bei dem einzelne LHCI-Monomere des PSI-LHCI-Holokomplexes gegeneinander ausgetauscht werden können.

F Zusammenfassung

Die beiden an der Lichtreaktion der Photosynthese beteiligten Photosysteme (PS) bestehen jeweils aus einem Kernkomplex, in dem sich die Ladungstrennung vollzieht, und einer Lichtsammelantenne, durch die der Absorptionsquerschnitt erhöht wird. Die Lichtsammelantenne des PSI (LHCI) ist hinsichtlich ihrer Protein- und Pigmentzusammensetzung weniger gut untersucht als die des PSII, da die LHC des PSI in der Thylakoidmembran in geringerer Menge vorkommen als z.B. der LHCI**II**b. Außerdem lassen sich Komponenten des LHCI nur als Mischfraktionen isolieren. Diese beiden Subkomplexe werden aufgrund ihres Fluoreszenzmaximums als LHCI-680 und LHCI-730 bezeichnet und enthalten entweder monomeren Lhca2 und Lhca3 (LHCI-680) oder ein Heterodimer aus Lhca1 und Lhca4 (LHCI-730). Allerdings gab es Hinweise darauf, dass Lhca2 und Lhca3 *in vivo* ebenfalls Dimere bilden. In Genomanalysen wurden neben Genen, die für die vier Standard-Lhca-Proteine (Lhca1-4) codieren, noch weitere potentielle *lhca*-Gene gefunden. Auf Proteinebene wurden zusätzliche Lhca-Proteine bisher jedoch noch nicht beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb zunächst die Isolation von nativen LHCI-Subkomplexen optimiert und deren Pigmentzusammensetzung untersucht. Zusätzlich wurde die Pigmentbindung analysiert sowie das Pigment/Protein-Verhältnis bestimmt. Außerdem wurden mit rekombinantem Lhca2 und Lhca3 *in vitro*-Rekonstitutionsexperimente durchgeführt, um deren Dimerisierungsverhalten zu untersuchen.

Die Analyse der Proteinzusammensetzung des LHCI erfolgte mittels einer Kombination aus ein- oder zweidimensionaler Gelelektrophorese mit Westernblotanalysen mit Lhca-Protein-spezifischen Antikörpern und massenspektrometrischen Untersuchungen. Dabei stellte sich heraus, dass der LHCI mehr Proteine bzw. Proteinisoformen enthält als bisher vermutet. So gelang durch die massenspektrometrischen Untersuchungen die Identifizierung zweier bisher noch nicht nachgewiesener Lhca-Proteine. Bei diesen handelt es sich um eine Isoform des Lhca4 (das Genprodukt des für Tomate beschriebenen *cab12*-Gens) und ein zusätzliches Lhca-Protein, das als Tomaten-Homolog des Lhca5 von *Arabidopsis thaliana* identifiziert wurde. Außerdem wurden in 1D-Gelen Isoformen von Lhca-Proteinen mit unterschiedlichem elektrophoretischen Verhalten beobachtet. In 2D-Gelen trat zusätzlich eine große Anzahl an Isoformen mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten auf. Es ist zu vermuten, dass zumindest ein Teil dieser Isoformen physiologischen Ursprungs ist, und z.B. durch differentielle Prozessierung oder posttranslationale Modifikationen verursacht wird, wenn auch die Spotvielfalt in 2D-Gelen wohl eher auf die Probenaufbereitung zurückzuführen ist.

Mittels *in vitro*-Rekonstitution mit anschließenden biochemischen Untersuchungen und Fluoreszenzmessungen wurde nachgewiesen, dass Lhca5 ein funktioneller LHC mit spezifischen Pigmentbindungseigenschaften ist. Außerdem zeigten *in vitro*-Dimerisierungsexperimente eine Interaktion zwischen Lhca1 und Lhca5, wodurch dessen Zugehörigkeit zur Antenne des PSI gestützt wird. *In vitro*-Dimerisierungsexperimente mit Lhca2 und Lhca3 führten dagegen nicht zur Bildung von Dimeren. Dies zeigt, dass die Interaktion in potentiellen Homo- oder Heterodimeren aus Lhca2 und/oder Lhca3 schwächer ist als die zwischen Lhca1 und Lhca4 oder Lhca5. Die Fluoreszenzemission der Lhca5-Monomere und Lhca1/Lhca5-Dimere

wies kaum Unterschiede auf, und auch in Anregungsspektren traten nur geringe Abweichungen auf. Dies deutet darauf hin, dass es durch die Interaktion von Lhca1 und Lhca5 nicht zu einer so starken Pigmentumordnung kommt, wie sie bei der Lhca1/Lhca4-Dimerisierung beobachtet wurde.

Die beobachtete Proteinheterogenität deutet daraufhin, dass die Antenne des PSI eine komplexere Zusammensetzung hat als bisher angenommen. Für die Integration „neuer“ LHC in den PSI-LHCI-Holokomplex werden zwei Modelle vorgeschlagen: geht man von einer festen Anzahl von LHCI-Monomeren aus, so kann sie durch den Austausch einzelner LHC-Monomere erreicht werden. Als zweites Szenario ist die Bindung zusätzlicher LHC vorstellbar, die entweder indirekt über bereits vorhandene LHC oder direkt über PSI-Kernuntereinheiten mit dem PSI interagieren.

In Hinblick auf die Pigmentbindung der nativen LHCI-Subfraktionen konnte gezeigt werden, dass sie Pigmente in einer spezifischen Stöchiometrie und Anzahl binden, und sich vom LHCIIB vor allem durch eine verstärkte Bindung von Chlorophyll *a*, eine geringere Anzahl von Carotinoiden und die Bindung von β -Carotin an Stelle von Neoxanthin unterscheiden. Der Vergleich von nativem LHCI mit rekonstituierten Lhca-Proteinen ergab, dass Lhca-Proteine Pigmente in einer spezifischen Stöchiometrie binden, und dass sie Carotinoidbindungsstellen mit flexiblen Bindungseigenschaften besitzen, wie sie auch schon für LHCI-Apoproteine beschrieben wurden. Zusätzlich ergab der Vergleich des Fluoreszenzspektrums von nativem LHCI-680 mit denen von rekonstituiertem Lhca2 und Lhca3, dass sich die LHCI-680-Fluoreszenz aus der Fluoreszenz der Lhca2- und Lhca3-Monomere zusammensetzt, und dass die vorhandene langwellige Fluoreszenz auf Lhca3 zurückzuführen ist.

Auch über die Umwandlung des an die einzelnen Lhca-Proteine gebundenen Violaxanthins (Vio) im Xanthophyllzyklus war nur wenig bekannt. Deshalb wurden mit Hilfe eines *in vitro*-Deepoxidationssystems sowohl native als auch rekonstituierte LHCI hinsichtlich ihrer Deepoxidationseigenschaften untersucht und der Deepoxidationsgrad von *in vivo* deepoxidierten Pigment-Protein-Komplexen bestimmt.

Aus den Deepoxidationsexperimenten konnte abgeleitet werden, dass in den verschiedenen Lhca-Proteinen unterschiedliche Carotinoidbindungsstellen besetzt sind. Außerdem bestätigten diese Experimente, dass der Xanthophyllzyklus auch im LHCI auftritt, wobei jedoch ein niedrigerer Deepoxidationsgrad erreicht wird als bei LHCI. Dies konnte durch *in vitro*-Deepoxidationsversuchen auf eine geringere Deepoxidierbarkeit des von Lhca1 und Lhca2 gebundenen Vio zurückgeführt werden. Damit scheint Vio in diesen Lhca-Proteinen eher eine strukturelle Rolle zu übernehmen. Unterstellt man Zeaxanthin auch im PSI eine photoprotektive Funktion, so wäre diese folglich auf Lhca3 und Lhca4 beschränkt. Damit enthält jede LHCI-Subfraktion ein LHC-Monomer mit langwelliger Fluoreszenz, das möglicherweise am Lichtschutz beteiligt ist.

Insgesamt zeigten die Untersuchungen der Pigmentbindung, der Deepoxidierung und der Fluoreszenzeigenschaften, dass sich die verschiedenen Lhca-Proteine in einem oder mehreren dieser Parameter unterscheiden. Dies lässt vermuten, dass schon durch leichte Veränderungen in der Proteinzusammensetzung des LHCI eine Anpassung an unterschiedliche Lichtverhältnisse erreicht werden kann.

G Literatur

- Adamska, I. (2001)** The Elip family of stress proteins in the thylakoid membranes of Pro- and Eukaryota. in Regulation of photosynthesis (Aro, E. M. Hrsg.) Vol. 8, 487-505 Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL
- Allen, J.F. (1995)** Thylakoid protein phosphorylation, state 1 state 2 transitions and photosystem-stoichiometry adjustment: redox control at multiple levels of gene expression - Minireview. *Physiol. Plant.* **93**, 196-205
- Allen, J. F. and Forsberg, J. (2001)** Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends Plant Sci.* **6**, 317-26
- Andersen, B., Koch, B., Scheller, H. V. (1992a)** Structural and functional analysis of the reducing side of photosystem I. *Physiol. Plant.* **84**, 154-161
- Andersen, B., Scheller, H. V., Møller, B. L. (1992b)** The PSI-E subunit of photosystem I binds ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase. *FEBS Lett.* **311**, 169-173
- Andersson, B. and Anderson, J. M. (1988)** Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **593**, 427-440
- Andersson, J., Walters, R. G., Horton, P., Jansson, S. (2001)** Antisense inhibition of the photosynthetic antenna proteins CP29 and CP26: Implications for the mechanism of protective energy dissipation. *Plant Cell* **13**, 1193-120.
- Andersson, J., Wentworth, M., Walters, R. G., Howard, C. A., Ruban, A. V., Horton, P., Jansson, S. (2003)** Absence of the Lhcb1 and Lhcb2 proteins of the light-harvesting complex of photosystem II – effects on photosynthesis, grana stacking and fitness. *Plant. J.* **35**, 350-381
- Arvidsson, P. O., Bratt, C. E., Carlsson, M., Åkerlund, H.-E. (1996)** Purification and identification of the violaxanthin deepoxidase as a 43 kDa protein. *Photosynth. Res.* **49**, 119-129
- Bailey, S., Walters, R. G., Jansson, S., Horton, P. (2001)** Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses. *Planta* **213**, 794-801
- Ballottari, M., Govoni, C., Caffarri, S., Morosinotto, T. (2004)** Stoichiometry of LHCI antenna polypeptides and characterization of gap and linker pigments in higher plants photosystem I. *Eur. J. Biochem.* **271**, 4659-4665
- Bassi, R., Machold, O., Simpson, D. (1985)** Chlorophyll-proteins of two photosystem I preparations from maize. *Carlsberg Res. Commun.* **50**, 145-162
- Bassi, R., Giacometti, G. M., Simpson, D. J. (1988)** Changes in the organization of stroma membranes induced by in vivo state 1 - state 2 transition. *Biochim. Biophys. Acta* **935**, 152-165
- Bassi, R., Soen, S. Y., Frank, G., Zuber, H., Rochaix, J. D. (1992)** Characterization of chlorophyll *a/b* proteins of photosystem I from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **267**, 25714-21
- Bassi, R., Pineau B., Dainese, P., Marquardt, J. (1993)** Carotenoid-binding proteins of photosystem II, *Eur. J. Biochem.* **212**, 297-303
- Bassi, R., Croce, R., Cugini, D., Sandona, D. (1999)** Mutational analysis of a higher plant antenna protein provides identification of chromophores bound into multiple sites. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **96**, 10056-10061
- Bassi, R. and Caffari, S. (2000)** Lhc proteins and the regulation of photosynthetic light-harvesting function by xanthophylls. *Photosynth.Res.* **64**, 243-256
- Bennett, J. (1991)** Protein phosphorylation in green plant chloroplasts. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**, 281-311
- Ben-Shem, A., Frolow, F., Nelson, N. (2003)** Crystal structure of plant photosystem I. *Nature* **426**, 630-635
- Ben-Shem, A., Frolow, F., Nelson, N. (2004)** Light-harvesting features revealed by the structure of plant photosystem I. *Photosynth. Res.* **81**, 239-250

- Bergantino, E., Sandona, D., Cugini, D., Bassi, R. (1998)** The photosystem II subunit CP29 can be phosphorylated in both C3 and C4 plants as suggested by sequence analysis. *Plant Mol. Biol.* **36**, 11-22
- Bergauer, V. (2000)** Heterologe Expression und *in vitro* Rekonstitution der Lichtsammelproteine Lhca2 und Lhca3. Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P. G., Gianazza, E., Gorg, A., Westermeier, R., Postel, W. (1982)** Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods* **6**, 317-339
- Blake, M. S., Johnston, K. H., Russell-Jones, G. J., Gotschlich, E. C. (1984)** A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal. Biochem.* **136**, 175-9
- Boekema, E. J., Wynn, R. M., Malkin, R. (1990)** The structure of spinach photosystem I studied by electron microscopy. *Biochim Biophys Acta* **1017**, 49-56
- Boekema, E. J., Jensen, P. E., Schlodder, E., van Breemen, J. F. L., van Roon, H., Scheller, H. V., Dekker, J. P. (2001)** Green plant photosystem I binds light-harvesting complex I on one side of the complex. *Biochemistry* **40**, 1029-1036
- Bossmann, B., Knoetzel, J., Jansson, S. (1997)** Screening of chlorina mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.) with antibodies against light-harvesting proteins of PSI and PSII: absence of specific antenna proteins. *Photosynth Res* **52**, 127-136
- Bradford, M. (1976)** A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 1029-1036
- Bratt, C. E., Arvidsson, P.-O., Carlsson, M., Åkerlund, H.-E. (1995).** Regulation of violaxanthin de-epoxidase activity by pH and ascorbate concentration. *Photosynth. Res.* **45**, 169–175
- Brettel, K. (1997)** Electron transfer and arrangement of the redox cofactors in photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* **1318**, 322-373
- Brettel, K., Leibl, W. (2001)** Electron transfer in photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* **1507**, 100-14
- Bugos, R.C., Yamamoto, H. Y. (1996)** Molecular cloning of violaxanthin de-epoxidase from romaine lettuce and expression in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6320–6325
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stueber, D., Müller, M., Ibrahim, I., Haeuptle, M.T., Dobberstein, B. (1987)** A T5-promoter-based transcription-translation system for the analysis of protein expression *in vivo* and *in vitro*. *Methods Enzymol.* **155**, 416-433
- Caffarri, S., Croce, R., Breton, J., Bassi, R. (2001)** The major antenna complex of photosystem II has a xanthophyll binding site not involved in light harvesting. *J. Biol. Chem.* **276**, 35924-33
- Caffarri, S., Croce, R., Cattivelli, L., Bassi, R. (2004)** A look within LHCII: differential analysis of the Lhcb1-3 complexes building the major trimeric antenna complex of higher-plant photosynthesis. *Biochemistry* **43**, 9467-76
- Castelletti, S., Morosinotto, T., Robert, B., Caffarri, S., Bassi, R., Croce, R. (2003)** Recombinant Lhca2 and Lhca3 Subunits of the Photosystem I Antenna System. *Biochemistry* **42**, 4226-4234
- Clark, S. E., Abad, M. S., Lamppa, G. K. (1989)** Mutations at the transit peptide-mature protein junction separate two cleavage events during chloroplast import of the chlorophyll *a/b*-binding protein. *J. Biol. Chem.* **264**, 17544-17550
- Cramer, W. A., Widger, W. R., Herrmann, R. G., Trebst, A. (1985)** Topography and function of thylakoid membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* **10**, 125-129
- Croce, R. and Bassi, R. (1998)** The light-harvesting complex of photosystem I: pigment composition and stoichiometry. in *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (Garab, G., Hrsg.) Vol. I, 421-424, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL
- Croce, R., Remelli, R., Varotto, C., Breton, J., Bassi, R. (1999a)** The neoxanthin binding site of the major light harvesting complex (LHCII) from higher plants. *FEBS Lett.* **456**, 1-6
- Croce, R., Weiss, S., Bassi, R. (1999b)** Carotenoid-binding sites of the major light-harvesting complex II of higher plants. *J. Biol. Chem.* **274**, 29613-23
- Croce, R., Morosinotto, T., Castelletti, S., Breton, J., Bassi, R. (2002a)** The Lhca antenna complexes of higher plant photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* **1556**, 29-40

- Croce, R., Canino, G., Ros, F., Bassi, R. (2002b)** Chromophore organization in the higher-plant photosystem II antenna protein CP26. *Biochemistry* **41**, 7334-43
- Dainese, P. and Bassi, R. (1991)** Subunit stoichiometry of the chloroplast photosystem II antenna system and aggregation state of the component chlorophyll *a/b* binding proteins. *J. Biol. Chem.* **266**, 8136-42
- Damm, I., Steinmetz, D., Grimme, L. H. (1990)** Multiple functions of beta-carotene in Photosystem I. in *Current Research in Photosynthesis* (Baltscheffsky, M., Hrsg.) Vol. II, 607-610, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA
- Dekker, J. P. and Boekema, E. J. (2005)** Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1706**, 12-39
- Demmig-Adams, B. (1990)** Carotenoid and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta* **1020**, 1-24
- Demmig-Adams, B.; Gilmore A.M. and Adams, W.W. (1996)** In vivo functions of carotenoids in higher plants. *FASEB J.* **10**, 403-412
- Dominici, P., Caffarri, S., Armenante, F., Ceoldo, S., Crimi, M., Bassi, R. (2002)** Biochemical properties of the PsbS subunit of photosystem II either purified from chloroplast or recombinant. *J. Biol. Chem.* **277**, 22750-8
- Dunahay, T. G., Schuster, G., Staehelin, L. A. (1987)** Phosphorylation of spinach chlorophyll-protein complexes: CP11, but not CP29, CP27, or CP24, is phosphorylated in vitro. *FEBS Lett.* **215**, 25-30
- Elich, T. D., Edelman, M., Mattoo, A. K. (1992)** Identification, characterization, and resolution of the *in vivo* phosphorylated form of the photosystem II reaction center protein. *J. Biol. Chem.* **267**, 3523-3529
- Färber, A., Young, A. J., Ruban, A. V., Horton, P., Jahns, P. (1997)** Dynamics of Xanthophyll-Cycle Activity in Different Antenna Subcomplexes in the Photosynthetic Membranes of Higher Plants (The Relationship between Zeaxanthin Conversion and Nonphotochemical Fluorescence Quenching). *Plant. Physiol.* **115**, 1609-1618
- Fischer, N., Boudreau, E., Hippler, M., Drepper, F., Haehnel, W., Rochaix, J. D. (1999)** A large fraction of PsfA is nonfunctional in photosystem I complexes lacking the PsfB subunit. *Biochemistry* **38**, 5546-5552
- Formaggio, E., Cinque, G., Bassi, R. (2001)** Functional architecture of the major light-harvesting complex from higher plants. *J. Mol. Biol.* **314**, 1157-66
- Frank, H. A., Cua, A., Chynwat, V., Young, A., Gosztola, D., Wasielewski, M. R. (1994)** Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis. *Photosynth. Res.* **41**, 389-395
- Friso, G., Giacomelli, L., Ytterberg, A. J., Peltier, J. B., Rudella, A., Sun, Q., Wijk, K. J. (2004)** In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. *Plant Cell* **2**, 478-99
- Fromme, P., Melkozernov, A., Jordan, P., Krauss, N. (2003)** Structure and function of photosystem I: interaction with its soluble electron carriers and external antenna systems. *FEBS Lett.* **555**, 40-44
- Funk, C., Adamska, I., Green, B. R., Andersson, G., Renger, G. (1995)** The nuclear-encoded chlorophyll-binding photosystem II-S protein is stable in the absence of pigments. *J. Biol. Chem.* **270**, 30141-30147
- Ganeteg, U., Strand, A., Gustafsson, P., Jansson, S. (2001)** The Properties of the Chlorophyll *a/b*-Binding Proteins Lhca2 and Lhca3 Studied in Vivo Using Antisense Inhibition. *Plant Physiol.* **127**, 150-158
- Ganeteg, U., Klimmek, F., Jansson, S. (2004)** Lhca5 – an LHC-type protein associated with photosystem I. *Plant. Mol. Biol.* **54**, 641-651
- Gerlach, U. (2002)** Untersuchung der Pigmentbindungsflexibilität von Lichtsammelproteinen des Photosystem I. Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Giuffra, E., Cugini, D., Croce, R., Bassi, R. (1996)** Reconstitution and pigment-binding properties of recombinant CP29. *Eur. J. Biochem.* **238**, 112-20
- Gómez, S. M., Bil, K. Y., Aguilera, R., Nishio, J. N., Faull, K. F., Whitelegge, J. P. (2003)** Transit peptide cleavage sites of integral thylakoid membrane proteins. *Moll. Cell Proteomics* **10**, 1068-85

- Gómez, S. M., Nishio, J. N., Faull, K. F., Whitelegge, J. P. (2002)** The Chloroplast Grana Proteome Defined by Intact Mass Measurements from Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *Moll. Cell Proteomics* **1**, 46-59
- Green, B. R., Pichersky, E., Kloppstech, K. (1991)** Chlorophyll *a/b*-binding proteins: an extended family. *TIBS* **16**, 181-186
- 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
- Hager, A. (1966)** Die Zusammenhänge zwischen lichtinduzierten Xanthophyll-Umwandlungen und der Hill-Reaktion. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **79**, 94–107
- Hager, A. (1969)** Lichtbedingte pH-Erniedrigung in einem Chloroplastenkompartiment als Ursache der enzymatischen Violaxanthin-Zeaxanthin-Umwandlung; Beziehungen zur Photophosphorylierung. *Planta* **89**, 224–243
- Hager, A. and Holocher, K. (1994).** Localization of the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light-dependent) pH decrease. *Planta* **192** 581–589
- Haldrup, A., Naver, H., Scheller, H.V. (1999)** the interaction between plastocyanin and photosystem I is inefficient in transgenic *Arabidopsis* plants lacking the PSI-N subunit of photosystem I. *Plant J.* **17**, 689-698
- Haldrup, A., Simpson, D.J., Scheller, H.V. (2000)** Downregulation of the PSI-F subunit of photosystem I (PSI) in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **275**, 31211-31218
- Haldrup, A., Jensen, P. E., Lunde, C., Scheller, H. V. (2001)** Balance of power: a view of the mechanism of photosynthetic state transitions. *Trends Plant Sci.* **6**, 301-5
- Harms, K. (2005)** Untersuchung der Proteinzusammensetzung des LHCI und der Heterogenität von Lhca-Proteinen bei verschiedenen Pflanzen, Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Havaux, M. and Davaud, A. (1994)** Photoinhibition of photosynthesis in chilled potato leaves is not correlated with a loss of Photosystem II activity: preferential inactivation of Photosystem I. *Photosynth. Res.* **40**, 75-92
- Haworth, P., Watson, J. L., Arntzen, C. J. (1983)** The detection, isolation, and characterization of a light-harvesting complex which is specifically associated with photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* **724**, 151-158
- Hippler, M., Klein, J., Fink, A., Allinger, T., Hoerth, P. (2001)** Towards functional proteomics of membrane protein complexes: analysis of thylakoid membranes from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* **28**, 595-606
- Hobe, S., Niemeier, H., Bender, A., Paulsen, H. (2000)** Carotenoid binding sites in LHCIIB: Relative affinities towards major xanthophylls of higher plants. *Eur. J. Biochem.* **267**, 616-24
- Hobe, S, Fey, H, Rogl, H, Paulsen, H. (2003)** Determination of relative chlorophyll binding affinities in the major light-harvesting chlorophyll *a/b* complex. *J. Biol. Chem.* **278**, 5912-9
- Hoffman, N. E., Pichersky, E., Malik, V. S., Castresana, C., Ko, K., Darr, S.C., Cashmore, A. R. (1987)** The nucleotide sequence of a tomato cDNA clone encoding a photosystem I protein with homology to photosystem II chlorophyll *a/b*-binding polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8844-8848
- Holt, N. E., Fleming, G. R., Niyogi, K. K. (2004)** Toward an understanding of the mechanism of non-photochemical quenching in green plants. *Biochemistry* **43**, 8281-8289
- Horton, P., Ruban, A. V., Rees, D., Pascal, A. A., Noctor, G., Young, A. J. (1991)** Control of the light-harvesting function of chloroplast membranes by aggregation of the LHCII chlorophyll-protein complex. *FEBS Lett.* **292**, 1-4
- Horton, P., Ruban, A. V., Walters, R. G. (1996).** Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 655–684
- Horton, P. and Ruban, A. (2004)** Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. *J. Exp. Bot.*, in Druck

- Huber, C.G., Timperio, A.M., Zolla, L. (2001)** Isoforms of Photosystem II Antenna Proteins in Different Plant Species Revealed by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Biol. Chem.* **276**, 45755-45761
- Huber, C. G., Walcher, W., Timperio, A. M., Troiani, S., Porceddu, A., Zolla, L. (2004)** Multi-dimensional proteomic analysis of photosynthetic membrane proteins by liquid extraction-ultracentrifugation-liquid chromatography-mass spectrometry. *Proteomics* **4**, 3909-20.
- Ihalainen, J. A., Gobets, B., Sznee, K., Brazzoli, M., Croce, R., Bassi, R., van Grondelle, R., Korppi-Tommola, J. E. I., Dekker, J. P. (2000)** Evidence for two spectroscopically different dimers of light-harvesting complex I from green plants. *Biochemistry* **39**, 8625-8631
- Ikeuchi, M, Hirano, A., Inoue, Y. (1991)** Correspondence of apoproteins of light-harvesting chlorophyll *a/b* complexes associated with Photosystem I to *cab* genes: evidence for a novel type IV apoprotein. *Plant Cell Physiol.* **32**, 103-11.
- Jackowski, G., Kacprzak, K., Jansson, S. (2001)** Identification of Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3 heterotrimers of the main light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex of photosystem II (LHCII). *Biochim. Biophys. Acta* **1504**, 340-345
- Jahns, P., Wehner, A., Paulsen, H., Hobe, S. (2001)** De-epoxidation of violaxanthin after reconstitution into different carotenoid binding sites of light-harvesting complex II. *J. Biol. Chem.* **276**, 22154-9
- Jansson, S. (1994)** The light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1184**, 1-19
- Jansson, S., Andersen, B., Scheller, H. V. (1996)** Nearest-neighbor analysis of higher-plant Photosystem I holocomplex. *Plant Physiol.* **112**, 409-420
- Jansson, S., Stefansson, H., Nyström, U., Gustafsson, P., Albertsson, P. A. (1997)** Antenna protein composition of PS I and PS II in thylakoid sub-domains. *Biochim. Biophys. Acta* **1320**, 297-309
- Jansson, S. (1999)** A guide to the Lhc genes and their relatives in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* **4**, 236-240
- Jensen, P. E., Gilpin, M., Knoetzel, J., Scheller, H. V (2000)** The PSI-K subunit of photosystem I is involved in the interaction between light-harvesting complex I and the photosystem I reaction center core. *J. Biol. Chem.* **275**, 24701-24708
- Jensen, P. E., Rosgaard, L., Knoetzel, J., Scheller, H. V. (2002)** Photosystem I activity is increased in the absence of the PSI-G subunit. *J. Biol. Chem.* **277**, 2798-2803
- Jensen, P. E., Haldrup, A., Rosgaard, L., Scheller, H. V. (2003)** Molecular dissection of photosystem I in higher plants: topology, structure and function. *Physiol. Plant.* **119**, 313-321
- Jensen, P. E., Haldrup, A., Zhang, S., Scheller, H. V. (2004)** The PSI-O subunit is of plant photosystem I is involved in balancing the excitation pressure between the two photosystems. *J. Biol. Chem.* **279**, 24212-24217
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H. T., Kuklas, P., Saenger, W., Krauss, N. (2001)** Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* **411**, 909-917
- Kargul, J., Nield, J., Barber, J. (2003)** Three-dimensional reconstitution of a light-harvesting complex I-photosystem I (LHCI-PSI) supercomplex from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: Insights into light harvesting for PSI. *J. Biol. Chem.* **278**, 16135-16141
- Keuchel, R. (2003)** Untersuchung zur Lokalisierung langwelliger Chlorophylle in Lichtsammelkomplexen. Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Kjaerulff, S, Andersen, B, Nielsen, V. S., Moller, B. L., Okkels, J. S. (1993)** The PSI-K subunit of photosystem I from barley (*Hordeum vulgare* L.). Evidence for a gene duplication of an ancestral PSI-G/K gene. *J. Biol. Chem.* **268**, 18912-6
- Knoetzel, J., Svendsen, I., Simpson, D. J. (1992)** Identification of the photosystem-I antenna polypeptides in barley - isolation of 3 pigment-binding antenna complexes. *Eur. J. Biochem.* **206**, 209-215
- Knoetzel, J., Meyer, D. U., Grimme, L. H. (1995)** Phosphorylated Photosystem I antenna proteins in Barley. in *Photosynthesis: from Light to Biosphere* (Mathis, P. Hrsg.) Vol 1, 131-134, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL

- Knoetzel, J., Bossmann, B., Grimme, L. H. (1998)** Chlorina and viridis mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.) allow assignment of long-wavelength chlorophyll forms to individual Lhca proteins of photosystem I in vivo. *FEBS Lett.*, **436**, 339-342
- Kühlbrandt, W., Wang, D. N., Fujiyoshi, Y. (1994)** Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* **367**, 614-621
- Laemmli, U. K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Lam, E., Ortiz, W., Malkin, R. (1984)** Chlorophyll a/b proteins of photosystem I. *FEBS Lett* **168**, 10-14
- 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
- Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., An, X., Chang, W. (2004)** Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* **428**, 287-292
- Lokstein, H., Hartel, H., Hoffmann, P., Renger, G. (1993)** Comparison of chlorophyll fluorescence quenching in leaves of wild type with a chlorophyll *b*-less mutant of barley. *J. Photochem. Photobiol.* **19**, 217-225
- Lubben, T.H., Theg, S.M., Keegstra, K.G. (1988)** Transport of proteins into chloroplasts. *Photosynth. Res.* **17**, 173-194.
- Lunde, C., Jensen, P. E., Haldrup, A., Knoetzel, J., Scheller, H. V. (2000)** The PSI-H subunit of photosystem I is essential for state transitions in plant photosynthesis. *Nature* **408**, 613-615
- Ma, Y. Z., Holt, N.E., Li, X. P., Niyogi, K. K., Fleming, G. R. (2003)** Evidence for direct carotenoid involvement in the regulation of photosynthetic light harvesting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 4377-4382
- Macko, S., Wehner, A., Jahns, P. (2002)** Comparison of violaxanthin de-epoxidation from the stroma and lumen sides of isolated thylakoid membranes from Arabidopsis: implications for the mechanism of de-epoxidation. *Planta* **216**, 309-14
- Martinson, T. A. and Plumley, F. G. (1995)** One-step extraction and concentration of pigments and acyl lipids by sec-butanol from in vitro and in vivo samples. *Anal. Biochem.* **228**, 123-30
- Melkozernov, A. N., Schmid, V. H. R., Schmidt, G. W., Blankenship, R. E. (1998)** Energy redistribution in heterodimeric light-harvesting complex LHCl-730 of photosystem I. *J. Phys. Chem. B* **102**, 8183-8189
- Morosinotto, T., Castelletti, S., Breton, J., Bassi, R., Croce, R. (2002a)** Mutation analysis of Lhca1 antenna complex: Low energy absorption forms originate from pigment-pigment interactions. *J. Biol. Chem.* **277**, 36253-61
- Morosinotto, T., Baroni, R., Bassi, R. (2002b)** Dynamics of chromophore binding to Lhc proteins in vivo and in vitro during operation of the xanthophyll cycle. *J. Biol. Chem.* **277**, 36913-36920
- Morosinotto, T., Breton, J., Bassi, R., Croce, R. (2003a)** The nature of a chlorophyll ligand in Lhca proteins determines the far red fluorescence emission typical of photosystem I. *J. Biol. Chem.* **278**, 49223-9
- Morosinotto, T., Caffarri, S., Dall'Osto, L., Bassi, R. (2003b)** Mechanistic aspects of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids. *Phys. Plant.* **119**, 347-354
- Mortz, E., Vorm, O., Mann, M., Roepstorff, P. (1994)** Identification of proteins in polyacrylamide gels by mass spectrometric peptide mapping combined with database search. *Biol. Mass Spectrom.* **23**, 249-261
- Moseley, J. L., Allinger, T., Herzog, S., Hoerth, P., Wehinger, E., Merchant, S., Hippler, M. (2002)** Adaptation to Fe-deficiency requires remodeling of the photosynthetic apparatus. *EMBO J.* **21**, 6709-6720
- Murphy, D. J. (1986)** The molecular organization of the photosynthetic membranes of higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* **864**, 33-94
- Naver, H., Haldrup, A., Scheller, H. V. (1999)** Cosuppression of photosystem I subunit PSI-H in *Arabidopsis thaliana*: Efficient electron transfer and stability of photosystem I is dependent upon the PSI-H subunit. *J. Biol. Chem.* **274**, 10784-9

- Naver, H., Scott, M. P., Andersen, B., Møller, B. L., Scheller, H. V. (1995)** Reconstitution of barley photosystem I reveals that the N-terminus of the PSI-D is essential for tight binding of PSI-C. *Physiol. Plant.* **95**, 19-26
- Nielsen, V. S., Scheller, H. V., Møller, B. L. (1996)** The photosystem I mutant *viridis-zb*⁶³ of barley (*Hordeum vulgare*) contains low amounts of active but unstable photosystem I. *Physiol. Plant.* **98**, 637-644
- Niyogi, K. K., Grossmann, A. R., Björkmann, O. (1998)** Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* **10**, 1121-1134
- Nußberger, S.; Dörr K.; Wang, D.N. and Kühlbrandt, W. (1993)** Lipid-protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex. *J. Mol. Biol.* **234**, 347-356
- Obokata, J., Mikami, K., Hayashida, N., Nakamura, M., Sugiura, M. (1993)** Molecular Heterogeneity of Photosystem I. *Plant Physiol.* **102**, 1259-1267
- O'Farrell, P. H. (1975)** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **10**, 4007-4021
- Olive, J., Vallon, O., Wollman, F. A., Recouvreur, M., Bennon, P. (1986)** Localization of the cytochrome b6/f in the thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **851**, 239-248
- Pagano, A., Cinque, G., Bassi R. (1998)** In vitro reconstitution of the recombinant photosystem II light-harvesting complex CP24 and its spectroscopic characterization. *J. Biol. Chem.* **273**, 17154-65
- Pandini, V., Aliverti, A., Zanetti, G. (1999)** Interaction of the soluble recombinant PsaD subunit of spinach photosystem I with ferredoxin I. *Biochemistry* **33**, 10707-13
- Pascal, A., Gradinaru, C., Wacker, U., Peterman, E., Calkoen, F., Irrgang, K. D., Horton, P., Renger, G., van Grondelle, R., Robert, B., van Amerongen, H. (1999)** Spectroscopic characterization of the spinach Lhcb4 protein (CP29), a minor light-harvesting complex of photosystem II. *Eur. J. Biochem.* **3**, 817-23
- Paulsen, H., Rümmler, U., Rüdiger, W. (1990)** Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding proteins overexpressed in *Escherichia coli*. *Planta* **181**, 204-211
- Paulsen, H.; Finkenzeller, B. and Kühnlein, N. (1993)** Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein. *Eur. J. Biochem.* **215**, 809-816
- Peter, G. F. and Thornber, J. P. (1991)** Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *J Biol Chem* **266**, 16745-16754
- Pichersky, E., Hoffman, N. E., Bernatzky, R., Piechulla, B., Tanksley, S. D., Cashmore, A. R. (1987a)** Molecular characterization and genetic mapping of DNA sequences encoding Type I chlorophyll *a/b*-binding polypeptide of photosystem I in *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Plant Mol. Biol.* **9**, 205-216
- Pichersky, E., Hoffman, N. E., Malik, V. S., Bernatzky, R., Szabo, L., Cashmore, A. R. (1987b)** The tomato Cab-4 and Cab-5 genes encode a second type of CAB polypeptides localized in photosystem II, *Plant Mol Biol* **9**, 109-120
- Pichersky, E., Tanksley, S. D., Piechulla, B., Stayton, M. M., Dunsmuir, P. (1988)** Nucleotide sequence and chromosomal location of cab-7, the tomato gene encoding the type II chlorophyll *a/b*-binding polypeptide of photosystem I, *Plant Mol Biol* **11**, 69-71
- Pichersky, E., Brock, T. G., Nguyen, D., Hoffman, N. E., Piechulla, B., Tanksley, S. D., Green, B. R. (1989)** A new member of the cab gene family: structure, expression and chromosomal location of cab-8, the tomato gene encoding the type III chlorophyll *a/b*-binding polypeptide of photosystem I. *Plant Mol. Biol.* **12**, 257-270
- Pichersky, E., Jansson, S. (1996)** The light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding polypeptides and their genes in angiosperm and gymnosperm species. in *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (Ort, D. R., Yocum, C. F. Hrsg.) 507-521, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL
- Plumley, G. F., 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
- Porra, R. J., Thompson, W. A., Kriedemann, P. E. (1989)** Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* **975**, 384-394

- Potthast, S.** (2002) Pigmentbindung von rekonstituierten Lichtsammelkomplexen des Photosystem I. Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Premstaller, A., Oberacher, H., Huber, C. G.** (2000) High-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of single- and double-stranded nucleic acids using monolithic capillary columns. *Anal. Chem.* **72**, 4386-93
- Remelli, R., Varotto, C., Sandonà, D., Croce, R., Bassi, R.** (1999) Chlorophyll binding to monomeric light-harvesting complex. *J. Biol. Chem.* **274**, 33510-33521
- Rémy, R., Trémolières, A., Duval, J. C., Ambard-Bretteville, F., Dubacq, J. P.** (1982) Study of the supramolecular organization of light-harvesting chlorophyll protein (LHCP): conversion of the oligomeric form into the monomeric one by phospholipase-a2 and reconstitution with liposomes. *FEBS Lett.* **137**, 271-275
- Rhee, K. H., Morris, E. P., Barber, J., Kühlbrandt, W.** (1998) Three-dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8 Å resolution. *Nature* **396**, 283-6
- Rivadossi, A., Zucchelli, G., Garlaschi, F. M., Jennings, R. C.** (1999) The importance of PS I chlorophyll red forms in light-harvesting by leaves. *Photosynth. Res.* **60**, 209-215
- Rogl, H. and Kühlbrandt, W.** (1999) Mutant trimers of light-harvesting complex II exhibit altered pigment content and spectroscopic features. *Biochemistry* **38**, 16214-22
- Ros, F., Bassi, R., Paulsen, H.** (1998) Pigment-binding properties of the recombinant photosystem II subunit CP26 reconstituted in vitro. *Eur. J. Biochem.* **253**, 653-8
- Ruban, A. V., Lee, P. J., Wentworth, M., Young, A. J., Horton, P.** (1999) Determination of the stoichiometry and strength of binding of xanthophylls to the photosystem II light harvesting complexes. *J. Biol. Chem.* **274**, 10458-65
- Rudolph, R. and Lilie, H.** (1996) In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* **10**, 49-56
- Rupprecht, J.** (2002) Bedeutung N- und C-terminaler Aminosäuren für die Monomer- und Dimerbildung von Lichtsammelproteinen des Photosystem I. Dissertation zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.** (1977) DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467
- Schäfer, C., Schmid, V. H. R., Roos, M.** (1994) Characterization of high light induced increases in xanthophyll cycle pigment and lutein contents in photoautotrophic cell cultures. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **22**, 67-75
- Scheller, H. V., Jensen, P. E., Haldrup, A., Lunde, C., Knoetzel, J.** (2001) Role of subunits in eukaryotic Photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* **1507**, 41-60
- Schmid, V. H. R. and Schäfer, C.** (1994) Alterations of the chlorophyll-pattern in chronically photoinhibited *Cenophobium rubrum* cells. *Planta* **192**, 473-479
- Schmid, V. H. R., Cammarata, K. V., Bruns, B. U., Schmidt, G. W.** (1997) In vitro reconstitution of the photosystem I light harvesting complex LHCI-730: heterodimerization is required for antenna pigment organization. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 7667-7672
- Schmid, V. H. R., Beutelmann, P., Schmidt, G. W., Paulsen, H.** (1998) in *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (Garab, G., Hrsg.), Vol. I, 425-428, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL
- Schmid, V. H. R., Thomé, P., Rühle, W., Paulsen, H., Kühlbrandt, W., and Rogl, H.** (2001) Chlorophyll b is involved in long-wavelength spectral properties of light-harvesting complexes LHCI and LHCII. *FEBS Lett.* **499**, 27-31
- Schmid, V. H. R., Potthast, S., Wiener, M., Bergauer, V., Paulsen, H., Storf, S.** (2002a) Pigment Binding of Photosystem I Light-harvesting Proteins. *J. Biol. Chem.* **277**, 37307-37314
- Schmid, V. H. R., Paulsen, H., Rupprecht, J.** (2002b) Identification of N- and C-terminal amino acids of Lhca1 and Lhca4 required for formation of the heterodimeric peripheral photosystem I antenna LHCI-730. *Biochemistry* **41**, 9126-31
- Schwartz, E., Shen, D., Aebersold, R., McGrath, J. M., Pichersky, E., Green, B. R.** (1991) Nucleotide sequence and chromosomal location of *cab11* and *cab12*, the genes for the fourth polypeptide of the photosystem I light-harvesting antenna (LHCI). *FEBS Lett.* **280**, 229-234

- Sigrist, M. and Staehelin, L. A. (1994)** Appearance of type 1, 2, and 3 light-harvesting complex II and light-harvesting complex I proteins during light-induced greening of barley (*Hordeum vulgare*) etioplasts. *Plant Physiol.* **104**, 135-145
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D.C. (1985)** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85
- Stahl, U., Tusov, V. B., Paschenko, V. Z., Voigt, J. (1989)** Spectroscopic investigations of fluorescence behaviour, role and function of the long-wavelength pigments of Photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* **973**, 198-204
- Standfuss, J. and Kühlbrandt, W. (2004)** The three isoforms of the light-harvesting complex II: spectroscopic features, trimer formation, and functional roles. *J. Biol. Chem.* **279**, 36884-91
- Stauber, E. J., Fink, A., Markert, C., Kruse, O., Johannngmeier, U., Hippler, M. (2003)** Proteomics of *Chlamydomonas reinhardtii* Light-harvesting proteins. *Eukaryot. Cell* **2**, 978-994
- Storf, S., Stauber, E. J., Hippler, M., Schmid, V. H. R. (2004)** Proteomic Analysis of the Photosystem I Light-Harvesting Antenna in Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Biochemistry* **43**, 9214–9224
- Storf, S., Jansson, S., Schmid, V. H. R. (2005)** Pigment binding, fluorescence properties and oligomerization behavior of Lhca5, a novel light-harvesting protein. *J. Biol. Chem.*, in Druck
- Svensson, P., Andreasson, E., and Albertsson, P.-A. (1991)** Heterogeneity among photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta* **1060**, 45-50.
- Takahashi, Y., Yasui, T. A., Stauber, E. J., Hippler, M. (2004)** Comparison of the subunit compositions of the PSI-LHCI supercomplex and the LHCI in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemistry* **43**, 7816-23
- Thayer, S. and Björkmann, O. (1992)** Carotenoid distribution and deepoxidation in thylakoid pigment-protein complexes from cotton leaves and bundle-sheath cells of maize. *Photosynth. Res.* **33**, 213-225
- Tjus, S. E., Roobol-Boza, M., Palsson, L. O., Andersson, B. (1995)** Rapid isolation of photosystem I chlorophyll-binding proteins by anion exchange perfusion chromatography. *Photosynth. Res* **45**, 41-49
- Tjus, S. E., Scheller, H. V., Andersson, B., Moller, B. L. (2001)** Active oxygen produced during selective excitation of photosystem I is damaging not only to photosystem I, but also to photosystem II. *Plant Physiol.* **125**, 2007-15
- van Thor, J. J., Geerlings, T. H., Matthijs, H. C., Hellingwerf, K. J. (1999)** Kinetic evidence for the PsaE-dependent transient ternary complex photosystem I/Ferredoxin/Ferredoxin:NADP(+) reductase in a cyanobacterium. *Biochemistry* **38**, 12735-46
- Varotto, C., Pesaresi, P., Jahns, P., Lessnick, A., Tizzano, M., Schiavon, F., Salamini, F., Leister, D. (2002)** Single and double knockouts of the genes for photosystem I subunits G, K, and H of Arabidopsis. Effects on photosystem I composition, photosynthetic electron flow, and state transitions. *Plant Physiol.* **2**, 616-24
- Verhoeven, A. S., Adams III, W. W., Demmig-Adams, B., Croce, R., Bassi, R. (1999)** Xanthophyll cycle pigment localization and dynamics during exposure to low temperatures and light stress in *vinca major*. *Plant Physiol.* **120**, 727-38
- Wehner, A., Storf, S., Jahns, P., Schmid V. H. R. (2004)** De-epoxidation of violaxanthin in light-harvesting complex I proteins. *J. Biol. Chem.* **279**, 26823-9
- Wessel, D. and Fluegge, U. I. (1984)** A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* **138**, 141-143
- White, M. J. and Green, B. R. (1988)** Intermittent-light chloroplasts are not developmentally equivalent to chlorine f2 chloroplasts in barley. *Photosynth. Res.* **15**, 195-203
- Wiener, M. (2000)** Überexpression und *in vitro* Rekonstitution des Photosystem I Lichtsammelkomplexes Lhca2. Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Yamamoto, H. Y., Nakayama, T. O. M., Chichester, C. O. (1962)** Studies on the light and dark interconversions of leaf xanthophylls. *Arch. Biochem. Biophys.* **97**, 168–173

Yamamoto, H. Y., Bassi, R. (1996) Carotenoids: Localization and Function. In *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (Ort, D. R., Yocum, C. F. Hrsg.) 539-563, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL

Yang, C., Kosemund, K., Cornet, C., Paulsen, H. (1999) Exchange of pigment-binding amino acids in light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein. *Biochemistry* **38**, 16205-16213

Zhang, H., Goodman, H. M., and Jansson, S. (1997) Antisense inhibition of the Photosystem I Antenna Protein Lhca4 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **11**, 1525-1531.

Zolla, L., Rinalducci, S., Timperio, A. M., Huber, C. G. (2002) Proteomics of Light-Harvesting Proteins in Different Plant Species: Analysis and Comparison by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Photosystem I. *Plant Physiol.* **130**, 1938-1950

Allgemeine Lehrbücher

Berg, L., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2003) Biochemie. 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin

Heldt, W. H. (2003) Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

Lottspeich, F. und Zorbas, H. (Hrsg) (1998) Bioanalytik. 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

Rehm, H. (2002) Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

Sambrook, J., Russel, D. W. (2004) Molecular Cloning: A laboratory manual. Vol. 1-3, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY, USA)

Anhang

Nucleotid- und Aminosäuresequenzen

Lycopersicon esculentum

Lhca1-matur

```

+1 Met Ser Ala Asp Trp Met Pro Gly Gln Pro Arg Pro Ser Tyr Leu Asp Gly
   ATGTCAGCTG ATTGGATGCC CGGGCAGCCC CGTCCATCTT ACCTCGACGG 50
+1 Ser Ala Pro Gly Asp Phe Gly Phe Asp Pro Leu Gly Leu Gly Glu Val Pro
   CTCAGCCCCC GGAGATTTTG GATTTGATCC ACTTGTTTA GGAGAAGTAC 100
+1 Ala Asn Leu Glu Arg Tyr Lys Glu Ser Glu Leu Ile His Cys Arg Trp
   CTGCAAATTT GGAAAGATAC AAAGAATCTG AACTTATTCA TTGCAGATGG 150
+1 Ala Met Leu Ala Val Pro Gly Ile Ile Val Pro Glu Ala Leu Gly Leu Gly
   GCTATGCTTG CTGTTCCCGG AATCATAGTA CCAGAAGCAT TGGGCTTAGG 200
+1 Asn Trp Val Lys Ala Gln Glu Trp Ala Ala Ile Pro Gly Gly Gln Ala Thr
   TAATTGGGTC AAGGCCAAG AATGGGCAGC CATTCTGGT GGACAAGCTA 250
+1 Tyr Leu Gly Gln Pro Val Pro Trp Gly Thr Leu Pro Thr Ile Leu Ala
   CATATTTGGG CCAGCCTGTT CCATGGGGAA CACTTCCTAC TATTTGGCT 300
+1 Ile Glu Phe Leu Ala Ile Ala Phe Val Glu His Gln Arg Ser Met Glu Lys
   ATTGAATTTT TAGCCATAGC CTTTGTAGAA CACCAAAGGA GTATGGAAAA 350
+1 Asp Ser Glu Lys Lys Lys Tyr Pro Gly Gly Ala Phe Asp Pro Leu Gly Tyr
   AGATTCAGAA AAGAAGAAGT ATCCTGGTGG GGCTTTTGAC CCATTGGGTT 400
+1 Ser Lys Asp Pro Ala Lys Phe Glu Glu Leu Lys Val Lys Glu Ile Lys
   ACTCTAAAGA CCCTGCTAAA TTTGAAGAAC TCAAAGTTAA GGAAATCAAG 450
+1 Asn Gly Arg Leu Ala Leu Leu Ala Phe Val Gly Phe Cys Val Gln Gln Ser
   AATGGTCGTC TTGCATTGTT GGCATTTGTG GGATTTTGTG TACAACAATC 500
+1 Ala Tyr Pro Gly Thr Gly Pro Leu Glu Asn Leu Ala Thr His Leu Ala Asp
   AGCATATCCA GGAACAGGAC CATTGGAGAA CTGGCAACT CACTTGGCTG 550
+1 Pro Trp His Asn Asn Ile Gly Asp Val Ile Ile Pro Lys Gly Ile Phe
   ACCCATGGCA CAACAACATT GGGGATGTTA TTATCCCTAA AGGCATTTTC 600
+1 Pro Asn
   CCTAAT 650

```

Lhca2-matur

```

+1 Val Ala Ala Asp Pro Asp Arg Pro Leu Trp Phe Pro Gly Ser Thr Pro Pro
   GTTGCTGCAG ACCCTGACAG ACCCTCTGG TTCCCTGGCA GCACCCACC 50
+1 Pro Trp Leu Asp Gly Ser Leu Pro Gly Asp Phe Gly Phe Asp Pro Leu Gly
   TCCATGGCTT GATGGCAGCC TTCCGGAGA CTTCGGTTTC GATCCTCTTG 100
+1 Leu Ala Ser Asp Pro Glu Ser Leu Arg Trp Asn Gln Gln Ala Glu Leu
   GTCTAGCATC TGATCCAGAG AGCTTGAGAT GGAACCAACA GGCAGAACTT 150
+1 Val His Cys Arg Trp Ala Met Leu Gly Ala Ala Gly Ile Phe Ile Pro Glu
   GTACTGCA GATGGGCAAT GTTGGGAGCT GCAGGAATTT TCATTCCAGA 200
+1 Leu Leu Thr Lys Ile Gly Ile Leu Asn Thr Pro Ser Trp Tyr Thr Ala Gly
   ATTACTCACA AAAATTGGAA TACTTAACAC ACCTTCATGG TACTGCTG 250
+1 Glu Gln Glu Tyr Phe Thr Asp Thr Thr Thr Leu Phe Ile Val Glu Leu
   GTGAACAAGA ATATTTACAG GACACAACAA CTCTCTTCAT CGTTGAATTG 300
+1 Val Leu Ile Gly Trp Ala Glu Gly Arg Arg Trp Ala Asp Ile Ile Lys Pro
   GTRACTTATTG GTTGGGCTGA GGAAGAAGA TGGGCAGATA TCATCAAGCC 350
+1 Gly Cys Val Asn Thr Asp Pro Ile Phe Pro Asn Asn Lys Leu Thr Gly Thr
   TGGATGCGTT AACACGGATC CAATCTTCCC TAACAACAAG CTCACGGGGA 400
+1 Asp Val Gly Tyr Pro Gly Gly Leu Trp Phe Asp Pro Leu Gly Trp Gly
   CAGATGTTGG TTATCCTGGA GGTTTATGGT TTGATCCCTT GGGTTGGGGT 450
+1 Ser Gly Ser Pro Ala Lys Ile Lys Glu Leu Arg Thr Lys Glu Ile Lys Asn
   TCGGGTTCAC CTGCAAAGAT AAAGGAGTTG AGGACAAAGG AGATTAAGAA 500
+1 Gly Arg Leu Ala Met Leu Ala Val Met Gly Ala Trp Phe Gln His Ile Tyr
   CGGTAGACTT GCTATGTTAG CCGTTATGGG TGCATGGTTC CAACACATTT 550
+1 Thr Gly Thr Gly Pro Ile Asp Asn Leu Phe Ala His Leu Ala Asp Pro
   AACTGGAAC AGGCCCTATT GATAACCTAT TTGCTCACCT AGCTGATCCT 600
+1 Gly His Ala Thr Ile Phe Ala Ala Phe Ser Pro Lys ...
   GGTCATGCCA CTATTTTTCG TGCATTGAGT CCCAAGTGA 650

```

Lhca3-matur

```

+1  Ala Ser Thr Pro Pro Val Lys Gln Gly Ala Asn Arg Gln Leu Trp Phe Ala
    GCTTCCACTC CACCAGTCAA GCAAGGAGCA AATAGGCAAC TCTGGTTTGC 50
+1  Ser Lys Gln Ser Leu Ser Tyr Leu Asp Gly Arg Leu Pro Gly Asp Phe Gly
    ATCCAAACAA AGCCTTTCAT ACTTGGATGG AAGGCTTCCC GGTGACTTTG 100
+1  Phe Asp Pro Leu Gly Leu Ser Asp Pro Glu Gly Thr Gly Gly Phe Ile
    GTTTTGATCC CTTGGGACTC TCGGACCCTG AAGGCACAGG AGGTTTCATC 150
+1  Glu Pro Lys Trp Leu Ala Tyr Gly Glu Val Ile Asn Gly Arg Phe Ala Met
    GAGCCGAAAT GGCTAGCATA TGGCGAGGTC ATCAATGGTC GGTTCGCCAT 200
+1  Leu Gly Ala Ala Gly Ala Ile Ala Pro Glu Ile Leu Gly Lys Ala Gly Leu
    GTTAGGAGCT GCAGGGGCAA TAGCACCAGA GATTCTTGA AAAGCTGGTC 250
+1  Ile Pro Gln Glu Thr Ala Leu Ala Trp Phe Gln Thr Gly Val Ile Pro
    TCATCCCACA AGAAACAGCA CTTGCATGGT TCCAAACTGG TGTATCCCA 300
+1  Pro Ala Gly Thr Tyr Asn Tyr Trp Ala Asp Asn Tyr Thr Leu Phe Val Leu
    CCAGCAGGAA CATACAACTA CTGGGCTGAC AATTACACAT TGTTTGTCT 350
+1  Glu Met Ala Leu Met Gly Phe Ala Glu His Arg Arg Phe Gln Asp Trp Ala
    TGAAATGGCA CTCATGGGCT TTGCTGAGCA CAGGAGATTC CAAGATTGGG 400
+1  Lys Pro Gly Ser Met Gly Lys Gln Tyr Phe Leu Gly Leu Glu Lys Gly
    CCAAACCTGG TTCAATGGGG AAACAATACT TCTTGGGTCT TGAAAAGGGT 450
+1  Leu Gly Gly Ser Gly Asp Pro Ala Tyr Pro Gly Gly Pro Leu Phe Asn Pro
    TTGGGTGGGT CAGGTGATCC AGCATACCCA GGTGGCCCAT TGTTTAACCC 500
+1  Leu Gly Phe Gly Lys Asp Glu Lys Ser Met Lys Glu Leu Lys Leu Lys Glu
    ACTTGGATTT GGAAAAGATG AAAAGTCTAT GAAGGAATTG AAGCTTAAGG 550
+1  Ile Lys Asn Gly Arg Leu Ala Met Leu Ala Ile Leu Gly Tyr Phe Ile
    AGATTAAGAA CGGAAGACTT GCTATGTTGG CTATTTTGGG ATACTTTATT 600
+1  Gln Ala Leu Val Thr Gly Val Gly Pro Tyr Gln Asn Leu Leu Asp His Leu
    CAAGCATTGG TTA CTGTTGT TGGACCTTAC CAAAACCTTC TTGATCATTT 650
+1  Ala Asp Pro Val Asn Asn Asn Val Leu Thr Ser Leu Lys Phe His ...
    GGCTGATCCA GTAAACAACA ATGTCTTGAC TAGTCTCAAG TTCTACTAA 700

```

Lhca4-matur

```

+1  Lys  Lys  Gly  Gln  Trp  Leu  Pro  Gly  Leu  Ala  Ser  Pro  Asp  Tyr  Leu  Asp  Gly
    AAGAAAGGTC AATGGCTTCC TGGCTTAGCC TCTCCTGATT ATCTTGATGG 50
+1  Ser  Leu  Pro  Gly  Asp  Asn  Gly  Phe  Asp  Pro  Leu  Gly  Leu  Ala  Glu  Asp  Pro
    CAGTCTCCCA GGAGACAATG GTTTTGATCC ATTGGGACTT GCGGAGGACC 100
+1  Glu  Asn  Leu  Lys  Trp  Phe  Ile  Gln  Ala  Glu  Leu  Val  Asn  Gly  Arg  Trp
    CAGAGAACTT GAAATGGTTC ATCCAGGCTG AACTGGTGAA TGGTCGTTGG 150
+1  Ala  Met  Leu  Gly  Val  Ala  Gly  Met  Leu  Leu  Pro  Glu  Val  Phe  Thr  Ser  Ile
    GCTATGTTGG GTGTTGCAGG GATGCTGTTG CCTGAAGTTT TCACTAGCAT 200
+1  Gly  Ile  Leu  Asn  Val  Pro  Lys  Trp  Tyr  Asp  Ala  Gly  Lys  Ser  Glu  Tyr  Phe
    TGGGATACTT AATGTGCCCA AATGGTACGA TGCTGGAAAA TCAGAGTACT 250
+1  Ala  Ser  Ser  Ser  Thr  Leu  Phe  Val  Ile  Glu  Phe  Ile  Leu  Phe  His  Tyr
    TTGCATCATC ATCCACCCTG TTTGTGATCG AGTTCATCTT GTTCCACTAC 300
+1  Val  Glu  Ile  Arg  Arg  Trp  Gln  Asp  Ile  Lys  Asn  Pro  Gly  Ser  Val  Asn  Gln
    GTCGAGATCA GAAGGTGGCA AGACATTAAG AACCCAGGAA GTGTCAACCA 350
+1  Asp  Pro  Ile  Phe  Lys  Asn  Tyr  Ser  Leu  Pro  Pro  Asn  Lys  Cys  Gly  Tyr  Pro
    AGACCCTATC TTCAAGAACT ACAGCTTGCC TCCTAATAAA TGTGGATACC 400
+1  Gly  Gly  Ile  Phe  Asn  Pro  Leu  Asn  Phe  Ala  Pro  Thr  Glu  Glu  Ala  Lys
    CTGGTGGTAT TTTCAACCCA CTCAACTTTG CACCAACTGA AGAGGCCAAG 450
+1  Glu  Lys  Glu  Leu  Ala  Asn  Gly  Arg  Leu  Ala  Met  Leu  Ala  Phe  Leu  Gly  Phe
    GAGAAGGAAC TTGCTAATGG GAGATTGGCT ATGTTGGCAT TTTTGGGATT 500
+1  Ile  Val  Gln  His  Asn  Val  Thr  Gly  Lys  Gly  Pro  Phe  Asp  Asn  Leu  Leu  Gln
    TATAGTGCAG CACAATGTGA CTGGGAAGGG ACCTTTTGAC AACCTTCTGC 550
+1  His  Leu  Ser  Asp  Pro  Trp  His  Asn  Thr  Ile  Ile  Gln  Thr  Leu  Ser  Asn
    AGCACCTCTC TGACCCATGG CACAACACCA TCATCCAAAC ACTCAGCAAC 600
+1  ...
    TAG 650

```

Lhca5-precursor

```

+1 Met Glu Ile Ala Val Gly Arg Ser Phe Gln Val Leu Thr Leu Leu Ser Gly
  ATGGAGATTG CAGTGGGTAG AAGTTTCCAA GTTTGGACAT TATTGTCTGG 50
+1 Ser Ser Phe His Gly Lys Ser Ile Arg Arg Thr Cys Val Lys Gly Phe Asn
  TTCATCTTTT CATGGAAAGA GTATACGTAG AACTTGTGTA AAAGGATTTA 100
+1 Ser Thr Arg Ala Arg Lys Gly His Ser Leu Thr Pro Leu Ala Gln Ala
  ATTCGACTAG AGCTAGAAAA GGACATTCTC TAACACCTCT GGCTCAAGCT 150
+1 His Gln Arg Pro Thr Trp Leu Pro Gly Leu Asp Pro Pro Pro His Leu Asp
  CACCAAAGGC CAACATGGCT TCCTGGCCTT GACCCTCCAC CTCATCTTGA 200
+1 Gly Thr Leu Ala Gly Asp Phe Gly Phe Asp Pro Leu Gly Leu Gly Glu Asp
  TGGAACTCTT GCTGGAGATT TTGGTTTTGA TCCACTAGGA CTTGGAGAGG 250
+1 Pro Glu Ser Leu Lys Trp Tyr Val Gln Ala Glu Leu Val His Ala Arg
  ATCCTGAAAG TTTGAAATGG TATGTACAAG CAGAACTTGT TCATGCCCGC 300
+1 Phe Ala Met Ala Gly Val Ala Gly Ile Leu Leu Thr Asp Leu Leu Arg Val
  TTCGCCATGG CTGGGGTTGC TGAATACTT TTAAGTACTT TGCTTCGTGT 350
+1 Thr Arg Ile Arg Asp Leu Pro Val Trp Tyr Glu Ala Gly Ala Thr Lys Phe
  CACTCGAATA AGGGATTTGC CAGTGTGGTA TGAAGCAGGA GCTACAAAAT 400
+1 Asn Phe Ala Ser Thr Thr Thr Leu Leu Ile Ile Gln Leu Leu Leu Met
  TTAAGTTTGC CAGCACAAG ACTCTGCTCA TCATTCAACT ATTATTGATG 450
+1 Gly Phe Val Glu Thr Lys Arg Tyr Met Asp Phe Leu His Pro Gly Ser Gln
  GGGTTCGTTG AAACAAAAG GTACATGGAT TTTCTTCATC CTGGCTCTCA 500
+1 Ala Lys Pro Gly Ser Phe Phe Gly Leu Glu Ala Ala Leu Glu Gly Leu Glu
  AGCAAAACCT GGATCTTTTT TTGGACTAGA AGCTGCACTG GAAGGCCTTG 550
+1 Pro Gly Tyr Pro Gly Gly Pro Leu Leu Asn Pro Leu Gly Ile Gly Lys
  AACCAGGGTA TCCAGGTGGT CCTTTATTGA ATCCTCTTGG AATTGGAAAA 600
+1 Asp Ile Lys Asn Ala Lys Asp Trp Lys Leu Lys Glu Ile Lys Asn Gly Arg
  GATATCAAGA ATGCTAAAGA CTGGAACTG AAAGAGATTA AAAACGGACG 650
+1 Leu Ala Met Val Ala Met Leu Gly Ile Phe Val Gln Ala Ser Val Thr His
  CCTAGCTATG GTGGCTATGC TTGGTATCTT CGTTCAGGCT TCTGTACTC 700
+1 Val Gly Pro Ile Asp Asn Leu Ile Asp His Leu Ser Asn Pro Trp His
  ATGTTGGTCC TATTGACAAT CTGATCGATC ATCTCTCCAA TCCATGGCAC 750
+1 Lys Thr Ile Leu Gln Thr Ile Ala Ala Ser Ser Ser ...
  AAAACCATTC TTCAAACCAT TGCTGCATCG AGTTCTTGA 800

```


Arabidopsis thaliana**Lhca5-precursor**

```

+1  Met  Ala  Val  Val  Leu  Arg  Gly  Gly  Ile  Thr  Gly  Gly  Phe  Leu  His  His  Arg
    ATGGCCGTAG TTTTACGTGG AGGCATCACC GGAGGATTC TTCACCATCG 50
+1  Arg  Asp  Ala  Ser  Ser  Val  Ile  Thr  Arg  Arg  Ile  Ser  Ser  Val  Lys  Ala  Ala
    TCGTGACGCT TCATCCGTCA TCACAAGAAG AATCTCATCC GTCAAAGCCG 100
+1  Gly  Gly  Gly  Ile  Asn  Pro  Thr  Val  Ala  Val  Glu  Arg  Ala  Thr  Trp  Leu
    CAGGAGGAGG CATCAACCCA ACGGTGGCTG TTGAACGTGC CACGTGGCTA 150
+1  Pro  Gly  Leu  Asn  Pro  Pro  Pro  Tyr  Leu  Asp  Gly  Asn  Leu  Ala  Gly  Asp  Tyr
    CCTGGACTAA ACCCTCCTCC TTATCTTGAT GGAAATTTAG CTGGAGATTA 200
+1  Gly  Phe  Asp  Pro  Leu  Gly  Leu  Gly  Glu  Asp  Pro  Glu  Ser  Leu  Lys  Trp  Tyr
    CGGGTTTGAC CCACTCGGGT TAGGAGAGGA TCCGGAAAGC TTGAAGTGGT 250
+1  Val  Gln  Ala  Glu  Leu  Val  His  Ser  Arg  Phe  Ala  Met  Leu  Gly  Val  Ala
    ATGTTCAAGC AGAGCTTGTT CACTCTCGTT TCGCTATGCT CGGTGTGCA 300
+1  Gly  Ile  Leu  Phe  Thr  Asp  Leu  Leu  Arg  Thr  Thr  Gly  Ile  Arg  Asn  Leu  Pro
    GGAATACTCT TCACTGATCT CCTTCGGACC ACAGGGATTC GTAATTTACC 350
+1  Val  Trp  Tyr  Glu  Ala  Gly  Ala  Val  Lys  Phe  Asp  Phe  Ala  Cys  Thr  Lys  Thr
    GGTTTGGTAT GAAGCTGGAG CTGTGAAATT TGATTTTGCT TGACAAAAA 400
+1  Leu  Ile  Val  Val  Gln  Phe  Leu  Leu  Met  Gly  Phe  Ala  Glu  Thr  Lys  Arg
    CTCTCATAGT TGTACAGTTT CACTTATGG GTTTGCTGA GACTAAAAGG 450
+1  Tyr  Met  Asp  Phe  Val  Ser  Pro  Gly  Ser  Gln  Ala  Lys  Glu  Gly  Ser  Phe  Phe
    TATATGGATT TTGTCTCTCC GGGATCACAA GCCAAAGAAG GATCGTTTTT 500
+1  Phe  Gly  Leu  Glu  Ala  Ala  Leu  Glu  Gly  Leu  Glu  Pro  Gly  Tyr  Pro  Gly  Gly
    CTTTGGACTT GAAGCAGCAC TCGAGGGGCT CGAGCCTGGA TATCCCGGAG 550
+1  Pro  Leu  Leu  Asn  Pro  Leu  Gly  Leu  Ala  Lys  Asp  Val  Gln  Asn  Ala  His
    GACCGCTTTT AAACCCATTA GGCCTTGCTA AGGATGTTCA AAATGCTCAT 600
+1  Asp  Trp  Lys  Leu  Lys  Glu  Ile  Lys  Asn  Gly  Arg  Leu  Ala  Met  Met  Ala  Met
    GACTGGAAGC TTAAGGAGAT CAAGAACGGT CGTCTAGCGA TGATGGCGAT 650
+1  Leu  Gly  Phe  Phe  Val  Gln  Ala  Ser  Val  Thr  His  Thr  Gly  Pro  Ile  Asp  Asn
    GCTCGGGTTC TTTGTTCAAG CCTCTGTGAC TCACACTGGC CCTATTGATA 700
+1  Leu  Val  Glu  His  Leu  Ser  Asn  Pro  Trp  His  Lys  Thr  Ile  Ile  Gln  Thr
    ACCTTGTTGA GCATCTCTCT AATCCATGGC ATAAGACCAT CATTCAAACC 750
+1  Leu  Phe  Thr  Ser  Thr  Ser  ...
    CTCTTCACCT CTACATCTTA G 800

```



42

...