

Bedeutung N- und C-terminaler Aminosäuren für die Monomer-
und Dimerbildung von Lichtsammelproteinen des
Photosystems I

Dissertation zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg Universität
in Mainz

Jens Rupprecht
geboren in Iserlohn, Deutschland

Mainz, 2002

Tag der mündlichen Prüfung: 26.08.2002

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGEN	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Photosynthesemembran	2
1.1.1 Komponenten der Photosynthesemembran	3
1.2 Das Photosystem I	4
1.2.1 Kernkomplex	4
1.2.2 LHCI-bindende Untereinheiten	4
1.2.3 Lage und Orientierung des LHCI am Photosystem I	6
1.3 Lichtsammelproteine	7
1.3.1 Die LHCs des Photosystems I	7
1.3.2 Die LHCs des Photosystems II	9
1.3.3 LH1, ein Lichtsammelprotein der Purpurbakterien	10
1.4 Proteinfaltung	11
1.4.1 Konformation von Lhca1 und Lhca4	13
1.5 Zielsetzung der Arbeit	14
2 MATERIAL	16
2.1 Chemikalien und Reagentien	16
2.2 Geräte	16
2.3 Bakterienstämme	18
2.4 Größenstandards für Gelelektrophoresen	18
2.4.1 DNA-Marker	18
2.4.2 Proteinmarker	19
2.5 Expressionsplasmid	19
2.6 Klone	20
2.7 Tomaten zur Isolierung von Gesamtpigmentextrakt	20
3 METHODEN	21
3.1 Methoden der Mikrobiologie	21
3.1.1 Bakterienanzucht	21
3.1.2 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Bakterienzellen	21
3.1.3 Herstellung von Dauerkulturen	22
3.2 Herstellung von rekombinanten Lhca1 und Lhca4 Proteinen	22
3.2.1 Allgemeine molekulargenetische Methoden	22
3.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese	22
3.2.1.2 Plasmid-Isolierung	23
3.2.1.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	23
3.2.1.4 DNA-Aufreinigung	23

3.2.1.5 DNA-Quantifizierung	24
3.2.1.6 Restriktion von DNA.....	24
3.2.1.7 Ligation.....	26
3.2.1.8 Transformation	26
3.2.1.9 Kontrolle durch Restriktion und Sequenzierung.....	26
3.2.2 Mutagenese von Lhca1 und Lhca4	31
3.2.2.1 Herstellung von Deletionsmutanten	32
3.2.2.2 Herstellung von Punktmutanten	33
3.2.2.3 Terminologie der Mutanten	35
3.3 Herstellung der Rekonstitutions-Komponenten	35
3.3.1 Überexpression und Isolierung von Einschlußkörpern aus Bakterien.....	35
3.3.2 Protein-Quantifizierung.....	36
3.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
3.3.3.1 Voll denaturierende Gelelektrophorese.....	37
3.3.3.2 Schwach denaturierende Gelelektrophorese	38
3.3.4 Isolierung von Gesamtpigmentextrakt aus Tomatenblättern.....	39
3.3.5 Chl <i>a/b</i> -Quantifizierung.....	40
3.4 Rekonstitution und Charakterisierung der LHCs	40
3.4.1 Rekonstitution.....	40
3.4.2 Nachweis und Isolierung von LHCs	41
3.4.2.1 LHC-Auftrennung mittels schwach denaturierender Gelelektrophorese	42
3.4.2.2 LHC-Auftrennung mittels Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation	42
3.4.3 Charakterisierung rekonstituierter LHCs	42
3.4.3.1 Pigment-Quantifizierungen.....	42
3.4.3.2 Protein-Quantifizierung der LHC und Berechnung der Pigment/Protein-Stöchiometrie	44
3.4.3.3 Tieftemperatur-Fluoreszenzspektroskopie bei 77 K.....	45
3.4.3.4 CD-Spektroskopie	45
4 ERGEBNISSE.....	46
4.1 Mutagenese von Lhca1- und Lhca4-Proteinen.....	46
4.1.1 Strategie und Reihenfolge der Mutantengenerierung	47
4.1.2 Mutantenherstellung.....	48
4.2 <i>In vitro</i> Rekonstitution und Stabilitätsprüfung monomerer Komplexe von Lhca1 und Lhca4 durch schwach denaturierende LDS-PAGE.....	52
4.2.1 Bedeutung der N- und C-Termini für die Stabilität von Lhca1 und Lhca4	52
4.2.2 Biophysikalische Charakterisierung von Lhca1, Lhca4 und deren maximal verkürzten Deletionsmutanten	55
4.2.2.1 77 K Fluoreszenzemissionsspektroskopie	55
4.2.3 Biochemische Charakterisierung der letzten monomerbildenden Lhca-Mutanten	56
4.2.3.1 Einfluß der Deletionen auf die Chlorophyll <i>a/b</i> -Verhältnisse der letzten stabilen LHC-Mutanten.....	57
4.2.3.2 Einfluß der Deletionen auf die Pigmentzusammensetzung der letzten stabilen LHC-Mutanten.....	58
4.3 <i>In vitro</i> Rekonstitution und Stabilitätsuntersuchungen am LHCI-730.....	59
4.3.1 Dimerisierungsfähigkeit der Deletionsmutanten.....	59
4.3.2 Einfluß von Aminosäureaustauschen auf die Dimerbildung.....	65
4.3.2.1 Einfluß von Punktmutationen in den Termini des Lhca1 auf die Dimerbildung... 65	
4.3.2.2 Einfluß von Punktmutationen in den Termini des Lhca4 auf die Dimerbildung... 66	

4.3.2.3 Einfluß von Aminosäureaustauschen in den Transmembranhelices auf die Dimerbildung	66
4.3.3 Biophysikalische Charakterisierung der dimeren Komplexe	68
4.3.3.1 Fluoreszenzemissionsspektroskopie	68
4.3.3.2 CD-Spektroskopie	71
4.3.4 Biochemische Charakterisierung.....	72
4.3.4.1 Einfluß der Modifikationen auf die Chl <i>a/b</i> Verhältnisse.....	72
4.3.4.2 Einfluß der Deletionen auf die Protein/Chlorophyll-Stöchiometrie	72
5 DISKUSSION	74
5.1 Bedeutung von Tryptophan für die Bildung stabiler Protein-Komplexe.....	75
5.2 Stabilität und Eigenschaften modifizierter monomerer Pigment-Protein-Komplexe des Lhca1 und Lhca4.....	76
5.2.1 Der N-Terminus ist für die Bildung stabiler LHCs von Lhca1 und Lhca4 nicht essentiell	76
5.2.2 Deletionen am C-Terminus sind bis zum Ende der vierten Helix möglich.....	79
5.2.3 Terminale Deletionen haben bei Lhca1, Lhca4 und LHCII ähnliche Effekte	81
5.3 Der heterodimere LHCI-730 – Faktoren der Assemblierung	82
5.3.1 Identifizierung dimerbildender Bereiche und Aminosäuren	82
5.3.1.1 Die Bedeutung der N-Termini von Lhca1 und Lhca4 für die Dimerisierung	82
5.3.1.2 Involvierung der C-Termini in die Dimerbildung	83
5.3.1.3 Bedeutung der Punktmutationen für die Dimerbildung	87
5.3.1.4 Einfluß des Cofaktors Chlorophyll auf die Dimerstabilität	88
5.3.1.5 Bedeutung stabiler monomerer Komplexe für die Bildung von Dimeren	90
5.3.2 Assemblierungsmotive und Lipidbindung	92
5.3.3 Zusammenfassung der Diskussion	93
5.4 Ausblick	95
6 ZUSAMMENFASSUNG	96
7 LITERATUR.....	99
ANHANG.....	A-1
A.1 Primer	A-1
A.2 Aminosäure- und DNA-Sequenzen von Lhca1 und Lhca4.....	A-8
A.3 Aminosäuren.....	A-10

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	ATP-Synthase
BChl	Bakteriochlorophyll
bla	β -Lactamase-Gen
bp	Basenpaare
bR	Bacteriorhodopsin
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
cat	Chloramphenicoltransferase-Gen
CD	Circular Dichroismus
Chl	Chlorophyll
Cyt <i>b₆/f</i>	Cytochrom <i>b₆/f</i>
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreithol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELIP	<i>early-light-inducible-protein</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonysäure
HLIP	<i>high-light-inducible-proteins</i>
HPLC	<i>high-pressure-liquid-chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
K	Kelvin
Kap.	Kapitel
lac i	lac-Repressor
LB-Medium	Luria Bertrani-Medium
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LH	<i>light-harvesting antenna</i>
Lhc	<i>light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein</i>
LHC	<i>light-harvesting complex</i>
LIL	<i>light-harvesting-like</i>

MCS	<i>multiple cloning site</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
NADP	Nicotinamid-Adenindinukleotidphosphat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
OD	optische Dichte
OG	Octylglykosid
OPA	<i>one-phor-all-buffer</i>
ori	<i>origin of replication</i>
P _{N25}	Promotor aus dem Phagen T5
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PG	Phosphatidylglycerin
P/O	P _{N25} /O
PS	Photosystem
<i>Rb.</i>	<i>Rhodobacter</i>
RBS	Ribosomenbindestelle
RC	Reaktionszentrum
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEP	<i>stress-enhanced protein</i>
TAE	Tris/Acetat/EDTA
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylendiamin
U	Unit
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Im Jahr 2001 gelang der Abschluß einer der größten konzertierten Aktionen in der biologischen Wissenschaft, der Sequenzierung des menschlichen Genoms (Venter et al., 2001). Somit liegt für den Menschen, wie mittlerweile für viele andere Organismen, z.B. Reis (Yu et al., 2002), die komplette Nukleotidsequenz der DNA vor. Da die Basenabfolge alleine noch keine Informationen über Expressionsumfang und –zeitpunkt der Genprodukte liefert, werden diese Aspekte in einem neuen Forschungszweig (*Proteomics*¹) untersucht. Um Fakten bezüglich der Zusammenhänge zwischen Funktion und Struktur der Proteine zu erhalten, müssen weiterführende Studien zur Charakterisierung durchgeführt werden.

Ein Schwerpunkt der Protein-Analysen stellt, neben funktionellen Studien, die Aufklärung von Protein-Faltungen und Sequenz–Struktur Beziehungen dar. In diesem Kontext sollen u.a. die zur Assemblierung von Untereinheiten nötigen Strukturen, Wechselwirkungen und Mechanismen aufgeklärt werden. Von vielen Proteinen ist nicht bekannt, ob sie als Monomere oder zumindest temporär in Organisationsformen aus mehreren Polypeptiden existieren. Bei der Isolierung von Proteinkomplexen können die Bindungen multimerer Komplexe gelöst werden und die Zugehörigkeit ist nicht mehr erkennbar. Ein Verfahren, um die Wechselwirkung zweier oder mehrerer Proteine nachweisen zu können, ist u.a. das *Yeast-Two-Hybrid-System* (Fields und Song, 1989). Erst bei einer spezifischen Interaktion zweier Proteine wird die Expression eines Reportergens aktiviert und die Zellen können auf einem Selektionsnährboden wachsen. Information über das gebundene Protein kann durch Sequenzierung des im Plasmid integrierten Gens gewonnen werden. Mittels dieses Verfahrens wiesen z.B. Mason und Botella (2000) nach, daß die γ -Untereinheit der G-Proteine eine feste Bindung mit der β -Untereinheit eingeht, und machten sich dies für die erste Klonierung der γ -Untereinheit aus Pflanzen zu nutze. Auch Signaltransduktionswege konnten eingehender beleuchtet werden. Halfter et al. (2000) bewiesen, daß die Kinase SOS2 durch Bindung des calciumabhängigen Proteins SOS3 in *Arabidopsis thaliana* aktiviert wird.

Ist die Organisation von Proteinen bekannt, besteht die Möglichkeit durch gezielte Mutationen die Untereinheiten zu modifizieren. Die Substitution oder die Deletion von Aminosäuren bzw. Peptiden kann Aufschluß über deren Funktion im Protein liefern. Welche Folgen Veränderungen in der Aminosäure-Sequenz haben können, demonstrieren zwei Beispiele aus der medizinisch-biologischen Forschung, die auf veränderten Protein-Protein Interaktionen beruhen. Eines der bekanntesten Beispiele ist die Sichelzellanämie. Ein Aminosäureaustausch in der β -Kette des Hämoglobins sorgt für die Ausbildung langer Fasern durch Oligomerisierung der Proteine. Es kommt dadurch zur bekannten sichelartigen Verformung der Erythrozyten und damit verbunden zu einer reduzierten Sauerstoffaufnahme durch das Hämoglobin (Ingram, 1957; Watowich et al., 1993). Eine Mutation im *neu* Gen z.B. führt zu einer Dimerisierung, die eine Umwandlung des Neu-Rezeptors, durch dauerhafte Aktivierung der Tyrosin-Kinase Domäne, in ein Onkogen bewirkt (Sternberg und Gullick, 1989). Die Mutationen ziehen in beiden Fällen gravierende Veränderungen der Proteinstruktur und -funktion nach sich.

Durch die Molekulargenetik verfügt die Forschung über geeignete Instrumente, Veränderungen, wie sie z.B. in den pathogenen Genen vorkommen, zu simulieren oder gezielte Modifikationen schon am Gen vorzunehmen, um den Effekt auf die Proteinfaltung und die Stabilität von Untereinheiten und multimeren Proteinkomplexen zu untersuchen. So ist man in der Lage, Proteinabschnitte oder Aminosäuren, die als potentielle Interaktionspartner in Frage kommen, zu entfernen oder auszutauschen und den Effekt auf

¹ engl., Proteom = **protein complement expressed by the genome**

die Proteine oder die Assemblierung von Untereinheiten zu untersuchen. Solche Verfahren wurden mittlerweile bei einer Reihe von Proteinen angewendet, wie z.B. den Lichtsammelkomplexen (LH) von Purpurbakterien (Richter et al., 1991; Kehoe et al., 1998) oder dem Bacteriorhodopsin² (bR) von halophilen Archaea (Krebs et al., 1997; Isenbarger und Krebs, 1999). Am Glycophorin A, dem primären Sialoglycoprotein der humanen Erythrocyten-Membran, gelang auf diesem Wege die Identifizierung eines Dimerisierungsmotives im Bereich der Transmembranhelices (Lemmon et al., 1994), das durch Homologie-Vergleiche sogar in eine allgemein gültige Sequenz überführt werden konnte (Russ und Engelman, 2000).

Es existieren zur Zeit verschiedene Methoden, die einen Einblick in die Struktur von Molekülen allgemein und Proteinen im speziellen auf atomarer Ebene geben können. Die Kernresonanz-Spektroskopie (NMR, *nuclear magnetic resonance*) ermöglicht die Unterscheidung von Wasserstoff- und Kohlenstoff-Atomen in verschiedenen strukturellen Umgebungen durch unterschiedliche Beeinflussung des NMR-Signals. Mit ihrer Hilfe analysierten McKenzie et al. (1997) die Struktur der dimeren membrandurchspannenden Domäne des Glycophorin A. Dieses Protein bildet nur über Wechselwirkungen in Bereichen der Transmembranhelices spezifische Homodimere aus (Lemmon et al., 1992; McKenzie und Engelman, 1998).

Röntgen- und elektronenkristallographische Untersuchungen liefern die exakten Raumpositionen von Atomen im Molekül. Voraussetzung hierfür ist die Herstellung eines hochgeordneten Kristalls. Diese Methode bereitet bei der Herstellung von 3 D-Kristallen membranständiger Proteine, die für die hochauflösenden Röntgenstrukturaufklärungen benötigt werden, Schwierigkeiten, da diese aufgrund ihrer besonderen Umgebung im Lipid-Bilayer nur sehr schlecht in einem gleichmäßigen Gitter anzuordnen sind. Ein Membran-Protein, dessen Struktur mit einer Auflösung von 1.55 Å bestimmt werden konnte, ist das bR aus halophilen Archaea (Luecke et al., 1999). Die so gewonnenen Daten dienen der Identifizierung wichtiger strukturbildender Aminosäuren und liefern eine gute Basis für nachfolgende Mutationsanalysen (Krebs et al., 1997; Isenbarger und Krebs, 1999).

Kühlbrandt et al. (1994) gelang es ein Protein der Photosynthesemembran, den Lichtsammel-Komplex LHCII des Photosystems II (PSII) höherer Pflanzen, anhand von 2 D-Kristallen elektronenmikroskopisch zu untersuchen.

1.1 Photosynthesemembran

Die Photosynthesemembran ist in ihrer komplexen Organisation und Funktionsweise einzigartig. Wegen ihrer elementaren Bedeutung für das Leben auf der Erde ist sie ein wichtiges Untersuchungsobjekt. Das Membransystem, das man in gestapelte, geldrollenförmige Grana- und vereinzelt, langgezogene Stromathylakoide unterteilt, ist in einem speziellen Organell der Pflanzen, dem Chloroplasten, lokalisiert. Dieser ist durch zwei äußere Hüllmembranen vom umgebenden Cytosol der Zelle getrennt und entstammt, laut Endosymbionten-Theorie, einer Phagozytose von Vorläufern heutiger Cyanobakterien durch

² Das Bacteriorhodopsin (Oesterhelt und Stoeckenius, 1971) ist eine lichtgetriebene Ionen-Pumpe. Sekundäre Strukturelemente sind sieben Transmembranhelices, die eine ovale Pore ausbilden. Das Photopigment der Archaea ist Retinal, das kovalent über seine Aldehydgruppe an die ϵ -Aminogruppe des L-216 in der siebten Transmembranhelix gebunden ist (Oesterhelt et al., 1992). Die Assemblierung einzelner bR-Moleküle zu trimeren bR-Komplexen (bei zehn Lipidmolekülen pro bR-Monomer) und deren Assoziierung in der Membran, führt zu einer selbständigen Ausbildung eines regelmäßigen hexagonalen Gitters, das als Purpurmembra bezeichnet wird (Henderson und Unwin, 1975).

einzellige Eukaryoten. Die Gesamtheit der an der Lichtreaktion beteiligten Komponenten der Photosynthese ist in dieses spezielle innere Membransystem integriert oder damit assoziiert (Anderson und Andersson, 1988).

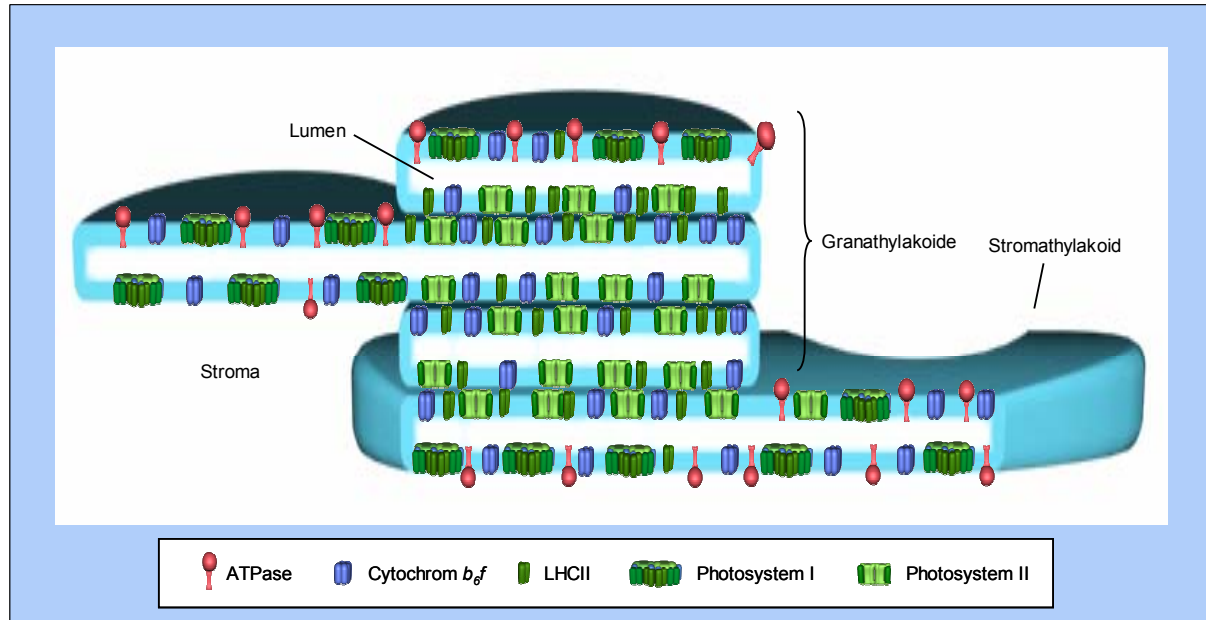


Abb. 1.1-1: Schematisches Diagramm eines aufgeschnittenen Thylakoidsystems. Die Abbildung zeigt die heterogene Verteilung der Photosynthese-Komponenten in der Membran (nach Häder, 1999).

1.1.1 Komponenten der Photosynthesemembran

Die Photosynthese³ beschreibt einen komplexen Prozeß, der die Absorption von Lichtquanten und eine daraus resultierende photoinduzierte Ladungstrennung beinhaltet. Die dort vorkommenden Polypeptide organisieren sich als Untereinheiten zu vier großen multimeren Komplexen. Das **Photosystem II** (PSII) wird in einen Kernkomplex und in die ihn umgebenden äußeren minoren und majoren Lichtsammler unterteilt. Der Kernkomplex wiederum setzt sich aus den Chl *a*-bindenden Antennen PSII-B (CP47) und PSII-C (CP43), die man auch als innere oder *Core* Antennen bezeichnet, und dem Reaktionszentrum (*reaction center*, RC) zusammen. Am PSII angelagert ist der wasserspaltenden Apparat. Der **Cytochrom b_6/f -Komplex** setzt sich aus wahrscheinlich 6 Untereinheiten zusammen, die zu einem Dimer assemblieren (Mosser et al., 1997). Der Komplex vermittelt den Übergang von einem Zwei-Elektronenüberträger (Plastohydrochinon) zu einem Ein-Elektronenüberträger (Plastocyanin). Dabei wird durch Protonentranslokation in das Lumen Energie konserviert. Das **Photosystem I** (PSI) ist ähnlich dem PSII in einen Kernkomplex und einen Lichtsammelapparat unterteilt. Das Photosystem erhält die nötigen Elektronen

³ Der Begriff „Photosynthese“ setzt sich aus den griechischen Begriffen *phos*, *photós* = Licht und *synthesis* = Aufbau, Zusammensetzung zusammen und beschreibt somit die Kernpunkte dieses Prozesses sehr treffend. Pflanzen (und photosynthetische Bakterien) nutzen die Energie der Sonneneinstrahlung, um Moleküle zu synthetisieren, die für den Stoffaufbau benötigt werden.

über das Plastocyanin vom Cytochrom *b₆/f*-Komplex nachgeliefert. Die durch den linearen Elektronentransport und den Q-Zyklus gebildete protonenmotorische Kraft wird durch die **ATP-Synthase** (ATPase) in chemische Energie in Form von ATP umgewandelt (Mitchell, 1961; Weber und Senior, 1997).

Die Komplexe des Photosyntheseapparates liegen nicht gleichmäßig in der Thylakoidmembran verteilt vor (Abb. 1.1-1). Die Grana- und Stromathylakoide sind gekennzeichnet durch einen unterschiedlichen Gehalt an photosynthetischen Proteinkomplexen, was als „Laterale Heterogenität“ bezeichnet wird. Ausnahmen bilden der LHCII (Andersson und Styring, 1991) und der Cytochrom *b₆/f*-Komplex, die in den Membranen beider Thylakoidtypen vorkommen (Gounaris et al., 1986; Olive et al., 1986). In den Granathylakoiden befinden sich das PSII und seine minoren Antennen. Die ATP-Synthase sowie das PSI, inklusive seines Antennenapparates, sind fast ausschließlich in den Stromathylakoiden lokalisiert (Cramer et al., 1985; Murphy, 1986).

1.2 Das Photosystem I

Das Photosystem I höherer Pflanzen besteht aus insgesamt 14 Untereinheiten. Es ist unterteilt in einen Kernkomplex (*Core*; Kap. 1.2.1) und einen Lichtsammelapparat (Kap. 1.3.1). Das *Core* umfaßt alle nicht-LHCI Untereinheiten.

1.2.1 Kernkomplex

Den essentiellen Bestandteil des PSI, das Reaktionszentrum, bilden die beiden membranständigen Untereinheiten PSI-A und PSI-B (die größten Pigment-Protein-Komplexe, je ca. 83 kDa). Ihre funktionelle Bedeutung wird durch eine hohe Homologie innerhalb aller PSI in Pflanzen und mit Reaktionszentren grüner Schwefelbakterien und Heliobakterien deutlich (Büttner et al., 1992; Liebl et al., 1993). Zusätzlich tragen sie neben den Cofaktoren P700, A₀, A₁ und F_x, die in die Ladungstrennung involviert sind, etwa 96 Chl *a*, um Licht absorbieren zu können. Sie vereinen somit, im Gegensatz zur PSII-Organisation, den zentralen Kernkomplex bestehend aus RC und innerer (Chl *a*-) Antenne in nur zwei Polypeptiden (Rhee et al., 1998). Die weiteren Untereinheiten, die nicht an der LHCI-Bindung beteiligt sind, sind in Tabelle 1.2-1 aufgeführt.

1.2.2 LHCI-bindende Untereinheiten

Die Bindung der Lichtsammelproteine an das PSI erfolgt sehr wahrscheinlich indirekt über spezielle Untereinheiten, die eine Assoziation an das RC vermitteln bzw. nicht ausschließlich an die Proteine des RCs binden (Abb. 1.2-1). Erste Untersuchungen weisen darauf hin, daß die Entfernung der PSI-K Untereinheit aus dem PSI gleichzeitig auch den Verlust von allen vier LHCI-Untereinheiten zur Folge hat (Kjaerulf et al., 1993). Verschiedene Untersuchungsansätze stützen mittlerweile die Annahme, daß die integralen Untereinheiten PSI-G und -K für die funktionelle Assemblierung des PSI-Kernkomplexes mit den Lichtsammelkomplexen unerlässlich sind. Da keine Wechselwirkungen von PSI-G und PSI-K mit anderen Untereinheiten des Kernkomplexes bewiesen werden konnten, vermutete man zunächst, daß die beiden Untereinheiten die Assoziation der LHCI-Proteine vermitteln.

Tab. 1.2-1: Zusammensetzung des Photosystems I höherer Pflanzen. C, chloroplastenkodiert; N, im Zellkern kodiert (nach Scheller et al., 2001).

Gene und Untereinheiten	Lokalisierung der Gene	Molekulare Masse [kDa]	Cofaktoren	Funktion
<i>psaA</i> ; PSI-A	C	83.2	ca. 96 Chl <i>a</i> , 22 β -Carotine, P700, A ₀	Lichtsammel-Protein (Rhee et al., 1998), Ladungstrennung, Elektronentransport (Brettel, 1997; Brettel und Leibl, 2001)
<i>psaB</i> , PSI-B	C	82.4	A ₁ , F _x	
<i>psaC</i> , PSI-C	C	8.8	F _A , F _B	Elektronentransport
<i>psaD</i> , PSI-D	N	17.6		Bindung von Ferredoxin, Bindung von PSI-C (Andersen et al., 1992; Pandini et al., 1999; Naver et al., 1995 und 1999)
<i>psaE</i> , PSI-E	N	10.8		Bindung von Ferredoxin und FNR; Beteiligung am cyclischen Elektronentransport (Andersen et al., 1992; van Thor et al., 1999)
<i>psaF</i> , PSI-F	N	17.5	Chl <i>a</i> ?	Bindung von Plastocyanin (Fischer et al., 1999) und LHCI-730 (Haldrup et al., 2000)
<i>psaG</i> , PSI-G	N	10.8	Chl <i>a</i> ?	Bindung von LHCI-680 (Jansson et al., 1996)
<i>psaH</i> , PSI-H	N	10.2	Chl <i>a</i> ?	Bindung von LHCII (Naver et al., 1999; Lunde et al., 2000); Stabilisierung von PSI-D (Andersen et al., 1992; Jansson et al., 1996)
<i>psaI</i> , PSI-I	C	4.0		Stabilisierung von PSI-L (Andersen et al., 1992; Jansson et al., 1996)
<i>psaJ</i> , PSI-J	C	5.0		Stabilisierung von PSI-F (Jansson et al., 1996; Fischer et al., 1999)
<i>psaK</i> , PSI-K	N	9.0	Chl <i>a</i> ?	Bindung von LHCI-680 (Kjaerulff et al., 1993; Jansson et al., 1996; Jensen et al., 2000)
<i>psaL</i> , PSI-L	N	18.0	Chl <i>a</i> ?	Stabilisierung von PSI-H (Andersen et al., 1992; Jansson et al., 1996)
<i>psaN</i> , PSI-N	N	9.8		Andockstelle für Plastocyanin (Nielsen et al., 1994; Haldrup et al., 1999 und 2000)
<i>lhca1</i> , Lhca1 ⁴	N	22	ca. 10 Chl <i>a</i> , 2 Chl <i>b</i> , 3 Carotinoide	Lichtsammel-Protein, LHCI-730 (Haldrup et al., 2000)
<i>lhca2</i> , Lhca2	N	23	ca. 10 Chl <i>a</i> , 2 Chl <i>b</i> , 3 Carotinoide	Lichtsammel-Protein, LHCI-680B (Knoetzel et al., 1998; Jensen et al., 2000)
<i>lhca3</i> , Lhca3	N	25	ca. 10 Chl <i>a</i> , 2 Chl <i>b</i> , 3 Carotinoide	Lichtsammel-Protein, LHCI-680A (Knoetzel et al., 1998; Jensen et al., 2000)
<i>lhca4</i> , Lhca4	N	22	ca. 10 Chl <i>a</i> , 2 Chl <i>b</i> , 3 Carotinoide	Lichtsammel-Protein, LHCI-730 (Haldrup et al., 2000)

⁴ Aufgrund der historischen Entwicklung, neuer Zuordnungen und Erkenntnisse, existieren eine Reihe von Bezeichnungen für die Lichtsammelkomplexe. In dieser Arbeit wird sich an der Nomenklatur von Jansson (1994) orientiert.

Tatsächlich gelang durch *cross-linking*-Studien die Isolierung von PSI-K - Lhca3 und PSI-G - Lhca2 Komplexen (Jansson et al., 1996). In Experimenten an der Gersten-Mutante *viridis-zb*⁶³, die außer PSI-G keine Core-Untereinheiten besitzt (Nielsen et al., 1996), fand man dennoch alle LHCI-Untereinheiten in normalen Mengen (Knoetzel et al., 1998). Und mittels Studien an transgener *Arabidopsis* ohne *psaK* gelang durch die Detektion eines reduzierten Energietransfers langwelliger Chlorophylle, für den die Lichtsammelkomplexe verantwortlich sind, und gleichzeitiger Abnahme von Lhca2 und Lhca3, der Nachweis, daß PSI-K mit dem LHCI assoziiert ist (Jensen et al., 2000). Farah et al. (1995) identifizierten das integrale Membranprotein PSI-F als Andockstelle für das *shuttle*-Molekül Plastocyanin. Die Untereinheit hat aber offensichtlich noch eine weitere Funktion, denn Pflanzen, die über kein PSI-F verfügen, sind nicht in der Lage Anregungsenergie vom LHCI-730 zu nutzen, obwohl die Expression der Untereinheiten nicht reduziert wurde. Dies deutet auf eine Interaktion zwischen PSI und Lichtsammel hin, die durch PSI-F optimiert wird (Haldrup et al., 2000).

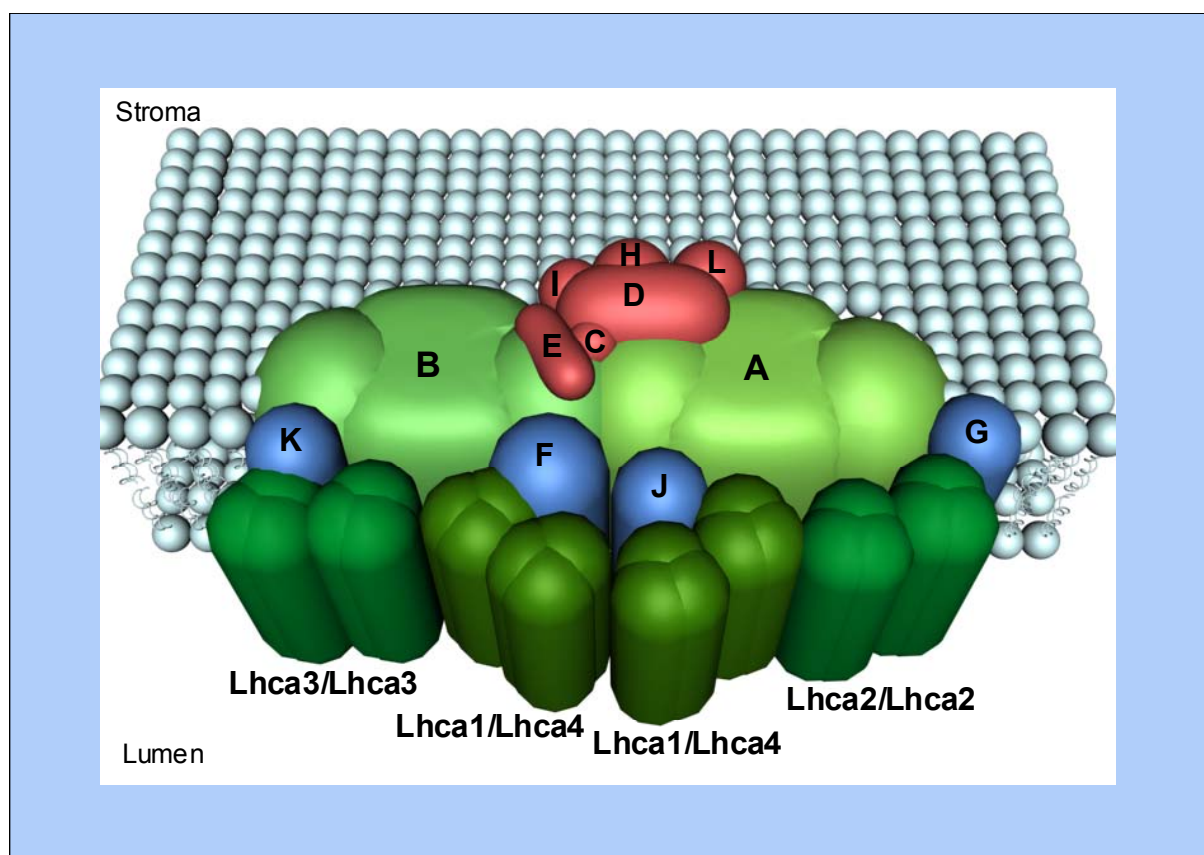


Abb. 1.2-1. Schematische Ansicht des Photosystems I (nach Scheller et al., 2001). Die Lokalisierung der Untereinheiten wurde aus Daten von *cross-linking*-Experimenten, funktionellen Studien und kristallographischen Untersuchungen bestimmt. Die Positionierung der LHCI-Untereinheiten wurde durch Elektronenmikroskopie ermittelt (Boekema et al., 2001).

1.2.3 Lage und Orientierung des LHCI am Photosystem I

Erste Ergebnisse zur Lokalisierung des Lichtsammelapparates des PSI wurden als eine ringförmig geschlossene Struktur bestehend aus einer Schicht Proteine um den gesamten Kernkomplex interpretiert (Boekema et al., 1990). Auf der Grundlage

elektronenmikroskopischer Daten konnte nun bewiesen werden, daß sich der LHCI nur auf der Seite der PSI-F/J Untereinheiten an den Core anlagert (Abb. 1.2.1; Boekema et al., 2001). Dabei handelt es sich um maximal acht, eventuell auch nur sechs Proteine (Boekema et al., 1990 und 2001; Jansson et al., 1996). Aus dem Elektrophorese-Muster des LHCI geht hervor, daß die Untereinheiten in gleicher Anzahl vorzuliegen scheinen, was einer Menge von sechs Proteinen widerspräche (Kap. 1.3.1). So zogen Scheller et al. (2001) in Betracht, daß zwei verschiedene PSI-Subpopulationen untersucht wurden, an denen sechs bzw. acht LHC-Polypeptide assoziiert waren und deren Vorkommen von Jansson et al. (1997) in unterschiedlichen Bereichen der Thylakoidmembranen bereits bewiesen werden konnten.

Scheller et al. (2001) entwickelten ein Modell für die Assoziierung und Orientierung der LHCI am PSI. Die LHCI-Dimere sind alle in Kontakt mit anderen LHCI-Untereinheiten (Jansson et al., 1996) und liegen auf einer Seite des PSI nebeneinander (Boekema et al., 2001). Zwei LHCI-730 Komplexe sind an den Untereinheiten PSI-F/J des Kernkomplexes positioniert und interagierten mit diesen, während LHCI-680A und LHCI-680B mit den Untereinheiten PSI-G und PSI-K an den beiden Polen des PSI-Kerns wechselwirken (Abb. 1.2-1).

1.3 Lichtsammelproteine

Die LHC-bildenden Apoproteine der Photosysteme gehören zur Familie der Chl *a/b*-bindenden Proteine (*cab*-Proteine). Die Apoproteine der *Arabidopsis*-LHCs besitzen eine Sequenzhomologie von mehr als 35% und ein gemeinsames hydrophobes Sequenzmotiv von 22 Aminosäuren mit drei unveränderlichen Aminosäuren, den polaren Glutamin und Arginin sowie Glycin (Jansson, 1999). Besonders auffällig sind drei hydrophobe Regionen, von denen die erste und die dritte ausgeprägte Homologien innerhalb der *cab*-Proteine aufweisen. Hydropathie-Plots deuteten darauf hin, daß es sich dabei um membrandurchspannende helicale Strukturen handeln könnte (Green et al., 1991). Diese Strukturannahme konnte mittlerweile durch die elektronenmikroskopische Strukturaufklärung des LHCIII bestätigt werden (Kühlbrandt et al., 1994). Den Großteil der LHC-Superfamilie höherer Pflanzen bilden die Lichtsammelkomplexe der Photosysteme, Lhca1-6 (PSI) und Lhcb1-6 (PSII). Dazu werden noch die *light-harvesting-like* (LIL) Proteine gezählt, die sich in die *stress-enhanced-proteins* (SEP), *early light-inducible proteins* (ELIP) und *high-light-inducible-proteins* (HLIP) untergliedern sowie die Ferrochelatase und PsbS (Jansson, 1996). Aufgrund der Sequenzhomologien vermutet man einen gemeinsamen evolutionären Ursprung der LHCs. Dabei soll es sich ursprünglich um ein 2-Helix-Protein gehandelt haben, wobei durch Genduplikation und Reduktion einer Helix das 3-Helix Motiv entstanden ist (Jansson et al., 1996).

Die Lichtsammelkomplexe der höheren Pflanzen dienen der Vergrößerung des Absorptionsquerschnittes der Photosysteme. Durch die zusätzliche Bindung von Chl *b* in den äußeren Antennen wird zudem das Absorptionsspektrum erweitert, das sich bei den Photosystemen und den minoren Antennen des PSII nur auf die Komplexierung von Chl *a* beschränkt.

1.3.1 Die LHCs des Photosystems I

Proteine und Proteinzusammensetzungen

Bei den LHCs des PSI handelt es sich ausschließlich um Chl *a/b*-bindende Moleküle. An der Bildung der Antenne des PSI sind insgesamt vier Apoproteine beteiligt, die Molekülmassen von 20 kDa bis 25 kDa besitzen (Tabelle 1.2-1; Ikeuchi et al., 1991; Knoetzel et al., 1992).

Zum ersten Mal wurde die Isolierung eines cab-Proteins des PSI von Haworth et al. (1983) beschrieben. Die Präparation von nativem LHCI mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation liefert zwei Subfraktionen, die in Proteinzusammensetzung und -gehalt unterschiedlich sind (Lam et al., 1984). Die Subfraktionen wurden entsprechend ihrer 77 K Fluoreszenzemission als LHCI-730 und LHCI-680 bezeichnet (Bassi und Simpson; 1987). Ikeuchi und Mitarbeiter (1991) isolierten den LHCI vom nativen PSI und konnten drei Pigment-Protein-Komplexe voneinander trennen. Sie ordneten dem LHCI-730 die Apoproteine Lhca1 und Lhca4 zu. Die beiden anderen bei 680 nm emittierenden LHCs wurden später von Knoetzel et al. (1992) bei Gerste (*Hordeum vulgare* L.) ebenfalls identifiziert und als LHCI-680A (Lhca3) und LHCI-680B (Lhca2) bezeichnet.

Der LHCI-730, so zeigten *in vitro* Versuche zur Rückfaltung rekombinanter Apoproteine mit Gesamtpigmentextrakt, ist ein heterodimerer Komplex bestehend aus den beiden kleinsten Apoproteinen der Lhca-Familie, Lhca1 und Lhca4. Der rekombinante LHC-730 ist spektroskopisch untersucht und mit dem nativen Pigment-Protein-Komplex verglichen worden. Fluoreszenzemission und CD-Absorption lieferten dabei sehr ähnliche Spektren für das native und rekombinante Untersuchungsobjekt (Schmid et al., 1997; Melkozernov et al., 1998). Über den Oligomerisierungsstatus von LHCI-680A und LHCI-680B gibt es bisher noch keine gesicherten Erkenntnisse. Mit verschiedenen analytischen Methoden kamen Croce und Bassi (1998) zu dem Ergebnis, daß der LHCI-680 als Dimer organisiert sein könnte. Dabei bleibt weiterhin unklar, ob die Assemblierung aus gleichen oder verschiedenen Untereinheiten erfolgt. Tjus et al. (1995) eluierten Lhca2 und Lhca3 aus einer Bande nach einer chromatographischen Säulentrennung. Lhca3 war dabei deutlich angereichert, so daß es offensichtlich mit dem Lhca2 kein Heterodimer bildet. Die PSI-K defiziente *Arabidopsis*-Mutante verliert gleichermaßen Lhca2 und Lhca3 (Jensen et al., 2000), was auf eine Interaktion der beiden Proteine hinweisen könnte, und auch die *antisense*-Hemmung einer der LHCI-680-Proteine führt zu einer gegenseitigen Beeinflussung der Expression des anderen Apoproteins (Ganeteg et al., 2001). Die Autoren glauben aber, da aufgrund von *cross-linking*-Experimenten keine stabile heterogene Assoziierung detektiert werden konnte (Jansson et al., 1996), daß Lhca2- und Lhca3-Homodimere miteinander in Kontakt stehen und sich gegenseitig beeinflussen. In *in vitro* Rekonstitutionsversuchen konnte bislang kein Dimer von Lhca2 gebildet werden (Wiener, 2000). Weitere Versuche unter modifizierten Bedingungen lieferten bislang weder heterodimere noch homodimere LHCs aus Lhca2 und Lhca3 (V. Schmidt, mündliche Mitteilung).

77 K Fluoreszenzemission des LHCI

Der LHCI unterscheidet sich in seinem 77 K Fluoreszenzemissionsspektrum deutlich von den Lichtsammelkomplexen des PSII. Nach der Untergliederung des LHCI in zwei spektroskopisch unterschiedliche Komponenten, den LHCI-730 und LHCI-680 (Lam et al., 1984), gelang Tjus et al. (1995) durch Untersuchungen an isolierten und Schmid et al. (1997) durch Rückfaltung von rekombinanten LHCI-730 Untereinheiten der Nachweis, daß in dem heterodimeren LHC nur die Lhca4-Untereinheit über diese langwellige Emission verfügt. Croce und Mitarbeiter (1998) demonstrierten durch Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie an nativem PSI von Mais (*Zea mays*), daß mindestens 80% der langwellig fluoreszierenden Chlorophylle dem LHCI zugeordnet werden können und wiesen damit nochmals Existenz und grobe Lokalisierung dieser Chlorophyllspezies nach. Eine genauere Ortung gelang Ihalainen und Mitarbeitern (2000). Sie vermuteten, daß eine Gruppe gekoppelter Chlorophylle, die bei 711 nm absorbieren und 733 nm emittieren, für das Phänomen verantwortlich ist. Ein Argument für die Involvierung von Chl *b* lieferten Versuche mit selektiver Chl *b*-Anregung. Die Folge war eine Zunahme der Fluoreszenzemission zwischen 720 nm und 750 nm (Mukerji und Sauer, 1993; Koehne et al., 1999). Schmid et al.

(2001) konnten durch Rekonstitutionsexperimente mit nur einer Chl-Spezies nachweisen, daß die langwellige Emission abhängig von der Anwesenheit von Chl *b* ist.

Die Funktion einer solchen langwellig emittierenden Antenne wird kontrovers diskutiert. Eine Antenne mit dieser Eigenschaft kann, so argumentieren Stahl et al. (1989), überschüssige Energie im Falle zu starker Sonneneinstrahlung ableiten und den Photosyntheseapparat schützen. Eine andere Publikation sieht sogar einen energetischen Vorteil durch die langwellig emittierenden Chlorophylle. Der Excitonen-Transfer zwischen LHCI-730 und PSI-Core ist zwar vermindert, daher kommt es aber zu einer Vergrößerung des Absorptionsquerschnittes (Trissl, 1993). Bei der Diskussion über die Bedeutung der langwellig fluoreszierenden Chl darf nicht außer Acht gelassen werden, daß diese Chlorophyll-Spezies nur einen Bruchteil der Gesamt-Chl-Menge ausmacht, so daß die physiologischen Konsequenzen eher gering wären. Die Energiedifferenz zwischen den langwellig fluoreszierenden Chl und dem P₇₀₀ kann sogar durch thermische Anregung schon bei Raumtemperatur überwunden werden, so daß ein Energietransfer entgegen dem Energiegefälle möglich wäre (Koehne et al., 1999).

Pigmentierung des LHCI

Zu den Pigment-Zusammensetzungen und Pigment-Stöchiometrien der Lhca-Komplexe existieren bislang nur wenige Untersuchungen. Erste Berechnungen aus Vergleichen von PSI mit Antennen-Komplexen und PSI ohne Lichtsammler sowie reinen LHCI Isolierungen, lieferten eine Menge von 70 bis 110 Chl *a* und *b* für die Gesamtheit der Lichtsammelkomplexe (Siefertmann-Harms, 1985; Damm et al., 1990). Basierend auf der Annahme, daß acht Proteine des LHCI die gesamte Antenne einer PSI-Einheit bilden (Croce und Bassi, 1998), läßt sich folgende Pigmentzusammensetzung für ein einzelnes Lhca-Protein ermitteln: 8 Chl *a*, 2 Chl *b*, 2 Carotinoide. Die Werte stellen nur eine grobe Annäherung an die tatsächlichen Verhältnisse dar und bergen die Gefahr, daß mögliche unterschiedliche Chromophor-Mengen der verschiedenen LHCI-Proteine nicht berücksichtigt werden. Sequenzvergleiche mit dem LHCI aus der Rotalge *Porphyridium cruentum* ergaben sechs Aminosäuren, die als potentielle Chl *a*-bindende Reste in Frage kommen (Tan et al., 1997). Mutagenesestudien an Lhcb4 und Lhcb1 deuten ebenfalls auf 6 mögliche Chl *a*-Moleküle pro LHCI-Monomer hin (Bassi et al., 1999; Remelli et al., 1999; Rogl und Kühlbrandt, 1999). Zumindest für LHCI-730 und seine Untereinheiten existieren präzisere Daten von Schmid et al. (1997). Durch chromatographische Bestimmungen von Chlorophyllen und Proteinquantifizierungen mittels BCA-Assay ermittelten die Autoren etwa 7 Chl in nativem und rekombinantem LHCI-730 pro Protein und liegen damit unter den oben angeführten Chl-Zahlen, die alleine 6-8 gebundene Chl *a* postulierten. Das Verhältnis von Chl *a* zu Chl *b* im nativen LHCI-730 lag, laut dieser Untersuchung, bei 2.57, d.h. etwa 5 Chl *a* und 2 Chl *b* pro Monomer. Wahrscheinlich wird ein Lutein pro Untereinheit gebunden. Verschiedene weitere Xanthophyll-Spezies konnten in sub-stöchiometrischen Mengen identifiziert werden, so daß insgesamt vermutlich insgesamt zwei Xanthophylle pro Monomer assoziiert sind.

1.3.2 Die LHCs des Photosystems II

Die Verwandtschaft der Lichtsammelproteine höherer Pflanzen, speziell die Beziehung von Lhca1 und Lhca4 zu LHCII ist ein wichtiger Punkt für das Verständnis und die Interpretation der erzielten Resultate am LHCI-730.

Der Lichtsammelapparat des PSII untergliedert sich in die Gruppe der Chl *a*-bindenden Proteine, die den minoren, inneren Lichtsammeler bilden, und die Chl *a/b*-bindenden Proteine,

die als majorer Lichtsammel-Komplex den peripheren Ring der PSII-Antennen höherer Pflanzen bilden (Jansson, 1994; Green und Durnford, 1996; Durnford et al., 1999). Die inneren LHCs werden von den Proteinen Lhcb4-6 gebildet und umschließen alle zusammen den PSII-Core (Schwartz und Pichersky, 1990; Pichersky et al., 1991; Morishige und Thornber, 1992). Es wird vermutet, daß sie die Interaktion von PSII-Kernkomplex und LHCII vermitteln (Bassi und Dainesse, 1992). Die LHCs aus den Apoproteinen Lhcb4-6 bilden jeweils monomere Assoziationsformen (Butler und Kühlbrandt, 1988; Guiffra et al., 1996; Jansson, 1999). Der majore LHCII wird von insgesamt drei Genen, *lhcb1*, *lhcb2* und *lhcb3*, kodiert und bildet einen trimeren Pigment-Protein-Komplex, dessen Untereinheiten-Zusammensetzung noch nicht vollständig geklärt werden konnte. Bislang konnten Lhcb1/Lhcb2-Heterotrimere sowie Lhcb1-Homotrimere nachgewiesen werden, die als Antennen für beide Photosysteme fungieren können. Trimere aus Lhcb3 (wahrscheinlich 2 Lhcb1/Lhcb3) scheinen nur an PSII assoziiert zu sein (Larsson et al., 1987). Durch hochauflösende nicht-denaturierende isoelektrische Fokussierung wurden mittlerweile weitere Trimer-Zusammensetzungen aufgeklärt. Aggregationen aus allen drei Apoproteinen und auch Homotrimere aus Lhcb1 wurden isoliert und mittels CD-Spektroskopie identifiziert (Jackowski und Pielucha, 2001; Jackowski et al., 2001). Die Pigmentbindung des LHCII beläuft sich auf 7-8 Chl *a*, 5-6 Chl *b* und 3 Xanthophylle (Kühlbrandt et al., 1994; Yang et al., 1999).

Der LHCII ist hinsichtlich der vermittelnden Bereiche für die Assemblierung der Untereinheiten ein gut untersuchtes Protein. Mutationsanalysen am N-Terminus des Lhcb1, der innerhalb der LHC-Proteine sehr variabel ist, führten zur Identifizierung eines Motivs, bestehend aus sechs Aminosäuren, das für die Assemblierung von LHCII-Monomeren zum Trimer verantwortlich ist (Hobe et al., 1995). Am C-Terminus, eine Region geringer Homologie zwischen den *cab*-Proteinen, wurde Tryptophan als eine entscheidende Aminosäure bei der Trimerisierung identifiziert (Kuttkat et al., 1996). Und eine chlorophyllbindende Aminosäureseitenkette ist ebenfalls in die Trimerisierung involviert (Yang et al., 1999). Untersuchungen zur Bedeutung terminaler Bereiche für die Stabilität und deren Einfluß auf die Pigmentbindung der monomeren LHCII-Untereinheiten zeigten, daß der N-Terminus entbehrlich ist, und am C-Terminus die vierte amphipathische Helix nicht vollständig entfernt werden darf (Cammarata und Schmidt, 1992; Paulsen und Hobe, 1992).

1.3.3 LH1, ein Lichtsammelprotein der Purpurbakterien

Die Lichtsammelproteine der Purpurbakterien bilden eine eigene Gruppe von Pigment-Protein-Komplexen. Sie bauen sich anders auf als die der höheren Pflanzen. Dennoch bieten diese Proteine für diese Arbeit am LHCI-730 interessante Vergleichsobjekte, da sich somit ein übergreifendes, allgemeingültiges Prinzip von Stabilität, Assemblierung und der daran beteiligten Komponenten in Pigment-Protein-Komplexen erstellen läßt. Aufgrund vorliegender Strukturdaten ist bekannt, wie sich die Proteine falten. Eine Reihe von Mutationsanalysen an rekombinanten und synthetischen Polypeptiden lieferten bisher anschauliche Informationen über die Prinzipien der Pigmentbindung sowie Bildung und Stabilität der Pigment-Protein-Komplexe.

Der LH1 ist die innere Antenne des RCs fakultativ phototropher Purpurbakterien (z.B. *Rhodobacter (Rb.) capsulatus*). Der LH1 bildet zusammen mit dem RC den Kernkomplex (Zuber und Brunisholz, 1991). Zu den Chromophoren der bakteriellen Lichtsammler gehören Bakteriochlorophyll (BChl) und als akzessorische Pigmente Carotinoide, die nicht-kovalent gebunden werden (Drews, 1985; Hawthornthwaite und Cogdell, 1991). Vom peripheren

Lichtsammler LH2 absorbierte Energie wird an den Kern-Lichtsammler LH1 weitergegeben, der seine Energie an das RC überträgt.

Die Struktur des LH2 wurde bereits von McDermott et al. (1995) aufgeklärt. Durch Strukturvergleiche mit LH2, biochemischen Untersuchungen und einer Strukturauflösung von 8.5 Å (Karrasch et al., 1995) sind mittlerweile fundierte Daten zum LH1 vorhanden. Er setzt sich aus zwei pigmentbindenden integralen Untereinheiten zusammen, die mit α und β bezeichnet werden. Der LH1 bildet zwei Ringe aus 24 oder 32 α - und β -Untereinheiten gleicher Stöchiometrie (Loach und Parkes-Loach, 1995; Francke und Amesz, 1995), die das RC umschließen. Der Holokomplex des LH1 setzt sich wahrscheinlich aus Sub-Untereinheiten in der Kombination $\alpha_1\beta_1\cdot 2$ BChl (Loach und Parkes-Loach, 1995) oder $\alpha_2\beta_2\cdot 4$ BChl (Sturgis und Robert, 1994) zusammen.

Am LH1 sind eine Reihe von Analysen an modifizierten Proteinen durchgeführt worden. Im Jahr 1992 zeigten Richter et al. durch Experimente mit Deletionsmutanten am N-Terminus des LH1 von *Rb. capsulatus* den Einfluß auf die Bildung von Subuntereinheiten ($\alpha_1\beta_1\cdot 2$ BChl) und den gesamten LH1-Komplex ($\alpha_{12}\beta_{12}\cdot 24$ BChl). Deletionen C-terminaler Proteinbereiche bewiesen, daß für die Interaktion von RC mit LH1 in *Rb. spaeroides* die C-terminalen Aminosäuren der α -Untereinheit verantwortlich sind (McGlynn et al., 1996). Eine Aminosäuresubstitution am α -Protein des LH1 von *Rb. capsulatus* bewies die Bedeutung des Tryptophans für die Assemblierung von Proteinen. Der Einbau von Alanin, das ähnlich hydrophob ist wie Tryptophan, verhinderte die LH1-Bildung (Richter et al., 1991), und deutete darauf hin, daß weitere Eigenschaften des Tryptophans für die Oligomerisierung und Proteinstabilität wichtig sein müssen. Die Bedeutung verschiedener Aminosäure-Seitenketten in der β -Untereinheit des LH1 von *Rb. spaeroides* wurde durch den Austausch konservierter Aminosäuren untersucht. Kehoe et al. (1998) identifizierten dabei ein extrinsisch gelegenes Tryptophan als eine wichtige Aminosäure für die Assemblierung von α - und β -Kette. Der Austausch des Tryptophans gegen Phenylalanin verringerte die Assoziationskonstante⁵ um den Faktor 500 und verschob die maximale Absorptionsbande um 12 nm gegenüber dem Wildtyp. Die Substitution der helicalen Aminosäure Arginin durch Leucin reduzierte $K_{Ass.}$ um das 30-fache und verhinderte die Bildung des LH1. Durch Messungen der Bindungsenergien von mutierten LH1-Subuntereinheiten von *Rb. spaeroides* und *Rb. capsulatus* identifizierte man Tyrosin als die entscheidende Aminosäure zur Stabilisierung der LH1-Subuntereinheiten. Für die Zunahme der Bindungsenergie wurde eine Wasserstoffbrückenbindung verantwortlich gemacht, in die Tyrosin involviert ist (Davis et al., 1997). Somit erweisen sich genetisch veränderte rekombinante Proteine als geeignetes Mittel, um Aussagen über Struktur-Sequenz Zusammenhänge treffen zu können.

1.4 Proteinfaltung

Bereits 1973 bewies Anfinsen durch Untersuchungen an der Ribonuclease vom Rind, daß die Information zur Bildung einer dreidimensionalen Proteinstruktur bereits in der Aminosäuresequenz festgelegt ist (Anfinsen, 1973). Die Länge einer Peptidkette bestimmt die Anzahl der Faltungsmöglichkeiten. Wie ein Protein faltet, wird durch die Wechselwirkungen der Aminosäureseitenketten festgelegt und ist abhängig von der physiologischen Umgebung in der Zelle. Die native Konformation durch zufälliges „Ausprobieren“ selbst bei kleinen Polypeptiden ($n = 100$ Reste) zu erreichen, würde einen Zeitraum benötigen, der größer ist als das Alter des Universum. So geht man heute von einem sogenannten hierarchischen Faltungsprozeß aus, der mit der Bildung kurzer

⁵ Die Assoziationskonstante $K_{Ass.}$ ist definiert als die Differenz freier Energie zwischen dem assoziierten und unassoziierten Zustand eines Proteins.

Abschnitte von Sekundärstrukturen beginnt, die zu größeren Faltungseinheiten (Domänen) kondensieren. Am Ende dieses Ablaufs bilden die Domänen zunächst das *molten globule*, eine locker organisierte, fast nativ gefaltete Polypeptidkette, aus der schließlich die native Tertiärstruktur gebildet wird (Goldberg, 1985; Baldwin und Rose, 1999). Bei der *in vivo* Faltung vieler Proteine sind Chaperone beteiligt, „Hilfsproteine“, die die Proteinfaltung organisieren und somit den Faltungsprozeß beschleunigen. Der Großteil der denaturierten Proteine faltet spontan von einem nahezu *random coiled* Zustand in seine korrekte funktionelle Konformation (Jaenicke, 1998).

Die Untersuchungen zur Proteinfaltung wurden in ihren Anfängen an wasserlöslichen Proteinen durchgeführt. Ein frühes Modell (*two-stage-model*) zur spezifischen Faltung von Membranproteinen wurde von Popot und Engelman (1990) entwickelt. Demnach bilden die α -Transmembranhelices zuerst unabhängig voneinander gefaltete Einheiten, diese assoziieren in einem zweiten Schritt durch van der Waals Kräfte, lipophobe Effekte oder die Bildung von Inter-Helix-Ionen-Paaren in der hydrophoben Umgebung (Lemmon et al., 1997).

Versuche zur Rückfaltung (Rekonstitution) von Membranproteinen gelangen mit isolierten oder rekombinanten LHCII-Proteinen in Detergenz-Lösungen in Anwesenheit von Pigmenten und Lipiden, ohne die Beteiligung von Chaperonen (Plumly und Schmidt, 1987; Paulsen et al., 1990; Cammarata et al., 1990). Der rekonstituierte LHCII faltete, laut spektroskopischen Untersuchungen, ähnlich dem isolierten nativen LHCII. Das Rekonstitutionsverfahren des LHCII konnte auf den LHCI-730 in modifizierter Form übertragen werden, so daß unter ähnlichen Bedingungen die Rückfaltung der Untereinheiten Lhca1 und Lhca4 sowie die Dimerbildung möglich ist (Kap. 3.4.1).

Protein-Protein-Interaktionen bilden die Basis für quaternäre und multimere Proteinkomplexe. Die Kräfte, die für die Faltung der Protein-Untereinheiten wichtig sind, z.B. Hydrophobizität, van der Waals Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen, sind ebenfalls für die Assemblierung der Untereinheiten verantwortlich (Stites, 1997). Die primäre Kraft der Protein-Assoziation ist die hydrophobe Wechselwirkung (Chothia und Janin, 1975). Die Assoziierung von zwei Proteinen setzt dabei eine spezifische Erkennung der Untereinheiten für eine stabile Assemblierung voraus (Duquerroy et al., 1991). Das zweite grundlegende Merkmal von Protein-Protein-Interaktionen ist die Komplementarität. Das schließt nicht nur die Gestalt der Kontaktflächen sondern auch die Oberflächenladungen von Peptidomänen mit ein.

Prinzipiell muß man zwei Formen von Protein-Protein-Interaktionen unterscheiden: i) permanente Dimere, die häufig aus identischen Polypeptiden gebildet werden und ii) nicht-obligate oder temporäre Dimere. Ein Beispiel für ein temporäres Dimer ist das Assoziierungsprodukt der α -Untereinheit des G-Proteins mit der Adenylatcyclase nach hormoninduzierter Aktivierung. In diesen Fällen ist eine spezifische reversible Interaktion wichtig. Das G-Protein ist auch Bestandteil einer Signalkaskade aus temporären Protein-Protein-Assoziierungen, die zelluläre Prozesse steuert, wie z.B. die Signalweiterleitung der Sieben-Helix-Rezeptoren. Permanente Dimere oder dimere Assemblierungsprodukte, wie z.B. das Hämoglobin oder die Ribulosebiphosphat-Carboxylase (Hartman und Harpel, 1994), weisen in der Regel einen höheren ΔASA^6 als die temporären Dimere auf (Jones und Thornton, 1995). Da eine Korrelation zwischen der hydrophoben freien Energie bei der Veränderung der Aminosäure-Umgebung von polar nach hydrophob und dem Lösungsmittel-ASA besteht, gibt ΔASA einen Einblick in Fläche und Art der Protein-Protein-Interaktion (Chothia, 1974). Damit ließ sich für wasserlösliche Proteine ermitteln, daß die Kontaktflächen von Proteinen, die auch als monomere Untereinheiten existieren, weniger hydrophob sind als

⁶ ASA = *accessible surface area*; ΔASA beschreibt die Veränderung, der für das Lösungsmittel zugänglichen Fläche im Protein beim Übergang vom monomeren in den dimeren Status.

die, die ausschließlich als Multimer vorkommen. Die freie Bindungsenergie an den Protein-Protein-Kontaktflächen ist nicht zwingend über den gesamten Bereich verteilt, sondern kann sich auf schmale Regionen beschränken. Diese Kontaktpunkte werden als *hot spots* bezeichnet und häufig von Tryptophan, Tyrosin oder Arginin besetzt.

1.4.1 Konformation von Lhca1 und Lhca4

1994 gelang es Kühlbrandt und Mitarbeitern ein auf elektronenmikroskopischen Daten beruhendes Atommodell des LHCII zu erstellen. Die nahe Verwandtschaft und der gemeinsame evolutionäre Ursprung der Proteine des LHCI-730 (Jansson, 1994) kann man nutzen, um Strukturannahmen aufgrund von Sequenzhomologien zwischen den Proteinen zu postulieren. Man findet bei den Untersuchungsobjekten dieser Arbeit, Lhca1 und Lhca4, und dem LHCII viele strukturbildende Bereiche und Aminosäuren konserviert (Abb 5.2-1).

Zwischen den Protein-Untereinheiten des LHCI-730 und Lhcb1 besteht eine ausgeprägte Sequenzhomologie von 35% (Lhca4) bzw. 43% (Lhca1) Identität⁷, die selbst zwischen den beiden LHCI-Proteinen mit 40% nicht signifikant höher liegt. Wichtige Aminosäuren sowie die Bereiche der ersten und dritten Transmembranhelix sind stark konserviert und die von Green und Pichersky (1994) erstellten Strukturvorhersagen deuten darauf hin, daß man für Lhca1 und Lhca4 eine dem LHCII ähnliche Konformation des Proteins annehmen kann. Am Hauptlichtsammler des PS II, dem LHCII, sind bereits eine Reihe von Experimenten zur Faltung und Stabilität der monomeren Untereinheiten (Cammarata und Schmidt, 1992; Paulsen und Hobe, 1992; Paulsen und Kuttkat, 1993) sowie zur Bildung von Trimeren (Hobe et al., 1995, Kuttkat et al., 1996; Yang et al., 1999; Rogl et al., 1999) durchgeführt worden.

Durch Vergleich der Primärstruktur von LHCII mit den beiden Untereinheiten des LHCI-730 lassen sich gerade die potentiell chlorophyllbindenden Aminosäuren fast alle als konserviert identifizieren (Abb. 5.2-1). Untersuchungen anhand von Aminosäuresubstitutionen konnten einen Großteil dieser Positionen für den Lhca4 bestätigen (Lago-Places, 2000; Thomé, 2000; Rautenberg, 2001). Ebenso sind die wichtigen strukturgebenden Aminosäuren Glutamat und Arginin, die an der Ausbildung zweier Ionenpaare beteiligt sind, in der ersten und dritten Transmembranhelix (Abb. 5.2-1) an analogen Positionen lokalisiert. Die Ionenpaar-Bindung erfolgt durch die ionische Wechselwirkung zwischen zwei Glutamat-Arginin-Paaren. Die Annahme einer ähnlichen Konformation der LHCI-Untereinheiten wird auch durch die Längen der drei Transmembranhelices gestützt. Durch den flachen Eintrittswinkel der Transmembranhelices 1 und 3 des LHCII (Abb. 1.4-1) von 32 ° zur Membransenkrechten muß die Anzahl helicaler Aminosäuren größer (nämlich 35 bzw. 30 Aminosäuren = 51 bzw. 43 Å) sein, um die Membran zu durchspannen, als bei Helix 2 (21 Aminosäuren = 31 Å; Eintrittswinkel, 9 °). Basierend auf der Strukturvorhersage von Green und Pichersky (1994) sind die Längen der Transmembranhelices von Lhca1 und Lhca4 analog (Tab. 1.4-1) und müssen daher die Membran in ähnlichen Winkeln durchspannen. Der LHCII bindet pro Monomer zwei Xanthophylle (Hobe et al., 2000), bevorzugt Lutein, die an Aminosäuren der Helixenden bzw. der Helix-angrenzenden Loops binden (Abb. 5.2-1). Für Lhca1 und Lhca4 konnte ein Lutein pro Untereinheit detektiert werden (Schmid et al., 1997). Die Aminosäuren für die Bindung des Lutein 1 sind in den LHCI-730 Untereinheiten gut konserviert, für das zweite Lutein ist das nicht der Fall (Abb. 5.2-1).

⁷ Die Werte wurden durch das Programm Blast 2 Sequences, Version BLASTP 2.1.2 [Oct-19-2000] vom National Center for Biotechnology Information (NCBI) ermittelt.

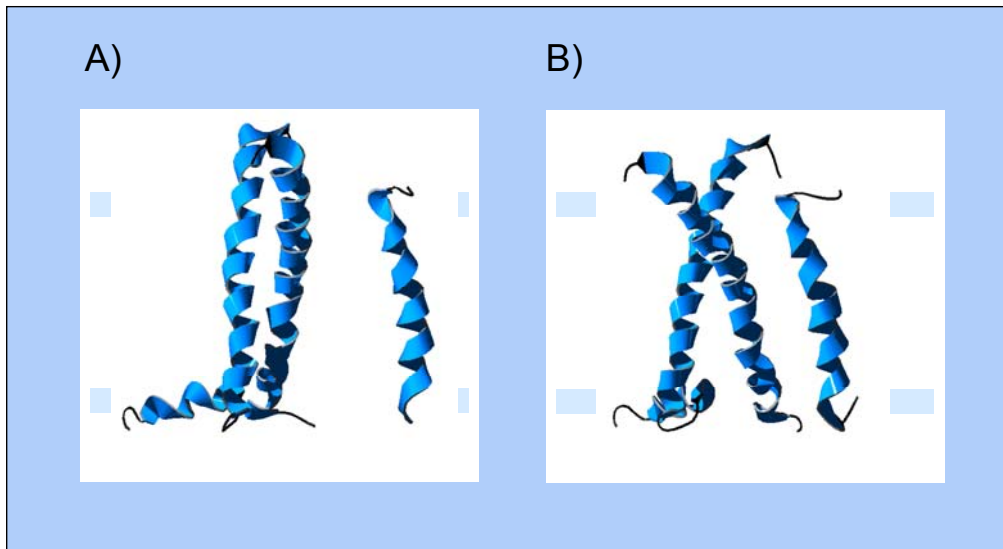


Abb. 1.4-1: Postuliertes Strukturmodell für LHCs, basierend auf den Daten des LHCII (Kühlbrandt et al., 1994). A) Seitenansicht, B) Frontansicht, um ca. 60 ° zur Seitenansicht in Uhrzeigerrichtung gedreht. Die Orientierung der Helices (blau) kann für die LHCs als ähnlich angenommen werden. Die Lage der Loops und Termini (schwarz) ist nicht gesichert und hier nur angedeutet. Die Helices sind entsprechend ihrer Abfolge in der Aminosäuresequenz nummeriert. Die blauen Balken zeigen die wahrscheinlichen Grenzen der Lipidbilayer an.

Die Sequenzhomologie zum LHCII bietet, gerade in den für die Strukturbildung wichtigen Bereichen, trotz fehlender Kristallstruktur der LHCI-730 Untereinheiten, die Möglichkeit eine Konformation des Lhca1 und Lhca4 postulieren zu können und für die Diskussion der erzielten Ergebnisse herangezogen werden zu können. Durch ein Homologie-Modelling, basierend auf den kristallographischen Daten des LHCII von Kühlbrandt et al. (1994), konnte für den Lhca4 eine Struktur postuliert werden, die bis auf die terminalen und die Loop-Regionen, eine ähnliche Faltung wie die des LHCII annehmen lässt (Schweikardt, 2001).

Tab. 1.4-1: Gegenüberstellung der Transmembranhelixlängen von LHCII und Lhca1 und Lhca4. Die Aminosäureanzahl der entsprechenden Helices ist im Verhältnis gleich. Dies deutet auf ähnliche Eintrittswinkel der Transmembranhelices durch die Membran hin.

Protein	Helix 1	Helix 2	Helix 3
Lhca1	33	27	34
Lhca4	34	27	32
LHCII	35	21	30

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Termini des LHCI-730 auf ihre Bedeutung für die Monomerbildung der Untereinheiten Lhca1 und Lhca4 sowie deren Dimer-Assemblierung untersucht werden.

Hohe Sequenzhomologien in der ersten und dritten Transmembranhelix sowie in den strukturbildenden und chlorophyllbindenden Aminosäuren lassen eine ähnliche Konformation der monomeren LHC-Proteine vermuten. Daneben existieren Regionen in den Polypeptiden, die sich deutlich unterscheiden und wahrscheinlich für die Dimerbildung verantwortlich sind.

Zu diesen Bereichen geringer Homologie gehören zweifellos die Termini, die Loops und die zweite Transmembranhelix. In Arbeiten von Cammarata und Schmidt (1992) sowie Paulsen und Hobe (1992) wurde gezeigt, daß die Termini nur bedingt für die Bildung von stabilem monomerem LHCII benötigt werden. In dieser Arbeit soll anhand von N- und C-terminal verkürzten Proteinen untersucht werden, ob und inwieweit terminale Aminosäuren von Lhca1 und Lhca4 entfernt werden dürfen, ohne die Fähigkeit zur Monomerbildung durch Auftrennung in einem schwach denaturierenden Gelsystem zu verlieren. Um die Relevanz und besondere Eigenschaften der letzten Aminosäure im monomerbildenden LHC untersuchen zu können, soll der Endpunkt der Monomerbildung präzise bestimmt werden.

Die Bildung einer höheren oligomeren Organisationsform durch Assemblierung von Untereinheiten ist ein sehr spezifischer Vorgang, der häufig ein Zusammenspiel mehrerer wechselwirkender Faktoren zwischen den Proteinen voraussetzt. Dazu zählen z.B. Interaktion zwischen Transmembranhelices, wie beim Glycophorin A und Wechselwirkungen zwischen Loop-Regionen und/oder Termini bei bR und dem LHCII. Die Dimersierung des LHCI-730 soll in dieser Arbeit im Hinblick auf die Relevanz von N- und C-Terminus beider Untereinheiten durch Deletionsmutanten untersucht werden. Dabei soll durch Aminosäuresubstitutionen herausgefunden werden, ob bestimmte, einzelne Aminosäuren als Interaktionspartner in Frage kommen oder kurze Protein-Abschnitte das Dimer stabilisieren.

Mittels spektroskopischer und chromatographischer Verfahren lassen sich Veränderungen, die die Stabilität der Pigment-Protein-Komplexe nur bedingt betreffen, anhand von Fluoreszenzmission, CD-Absorption der gebundenen Chlorophylle oder Bestimmungen der Pigment-Zusammensetzungen analysieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollen diese Methoden der Charakterisierung von Deletions- und Punktmutanten im Vergleich zu den Wildtypen dienen, um Veränderungen in den LHCs nicht nur auf der Ebene von Stabilitätsverlusten erfassen zu können.

Die Untersuchungen wurden mit rekombinanten Apoproteinen von Lhca1 und Lhca4 aus Tomaten durchgeführt. Die Modifizierung der Proteine, d.h. die Herstellung N- und C-terminal verkürzter Deletionsmutanten, erfolgte auf DNA-Ebene mittels PCR-Mutagenese. Die LHC-Rückfaltung (Rekonstitution) ist durch die Zugabe von Gesamtpigmentextrakt aus Tomaten-Thylakoiden möglich. Das Rekonstitutionsprodukt wurde anschließend mittels schwachdenaturierender Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Bildung einer grünen Bande auf Höhe der zum Vergleich herangezogenen Wildtyp-Bande war das Kriterium für den Nachweis eines stabilen monomeren bzw. dimeren LHCs.

Die Bildung stabiler monomerer LHCs wurde auch als Grundvoraussetzung angesehen, daß Lhca1 und Lhca4 zum Dimer assemblieren können. Zu diesem Zweck sollten zunächst die N- und C-terminalen Deletionsmutanten ermittelt werden, die gerade noch stabile Monomere bilden können. Ausgangspunkt waren Proteinverkürzungen bis zum Beginn der ersten (N-Terminus) bzw. bis zum Ende der dritten (C-Terminus) Transmembranhelix. Die Deletionsbereiche wurden, abhängig vom Erfolg der Monomerbildung, sukzessiv verkürzt bzw. verlängert bis die Aminosäure gefunden wurde, deren Entfernung das Ausbleiben einer Monomerbande im Elektrophoresemuster zur Folge hatte. Zur Identifizierung der kürzest möglichen Deletionsmutante, die mit dem Wildtyp der jeweils anderen Untereinheit noch Dimere bildete, wurde ausgehend von der kürzesten Monomer-Deletionsmutante das Apoprotein auf DNA-Ebene sukzessiv verkürzt bzw. verlängert. Die Aminosäure, deren Entfernung in der Deletionsmutante für das Ausbleiben einer Dimer-Bande sorgte, wurde durch punktspezifische PCR-Mutagenese nach Chen und Przybyla (1994) im Vollängenprotein substituiert, um ihre Bedeutung und die Besonderheit spezifischer Eigenschaften der Aminosäure an dieser Position analysieren zu können.

2 Material

2.1 Chemikalien und Reagentien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Bio-Rad (München), Merck (Darmstadt), Difco (Otto Nordwald KG, Hamburg), ICN Biomedicals (Eschwege), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen und hatten, wenn nicht anders erwähnt, p. A.-Qualität. Aceton und Ether wurden in reinst-Qualität bezogen und vor Verwendung destilliert.

Die Kits zur Präparation von Plasmiden, Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und PCR stammen von den Firmen Macherey-Nagel (Düren) und Promega (Mannheim). Die Primer zur Herstellung von Deletions- und Punktmutanten wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg) und Gen Tech (Mainz) synthetisiert.

2.2 Geräte

Geräte für den allgemeinen Gebrauch

Magnetrührer

Heidolph MR 3001 K8, Heidolph Elektro GmbH & Co KG (Kehlheim)
Ikamag RCT, IKA-Labortechnik (Staufen)

Mischer für Reaktionsgefäße

Vortex-Genie 2 (G-560E), Scientific Industries (New York, USA)

Schüttler

Heidolph Rotamax 120 T, Heidolph Elektro GmbH & Co KG (Kehlheim)

Photometer

U-2000 Spektrophotometer, Hitachi (Tokyo, Japan)
UV-2101 PC, UV-VIS Scanning Spectrophotometer, Shimadzu (Kyoto, Japan)

Spannungsquellen

Power Pac 300, Bio-Rad (Hercules, USA)
Standard Power Pack P25, Biometra (Göttingen)

Waagen

Analysenwaage: A 200 S, Sartorius (Göttingen)
Präzisionswaage: GS-3200-2, G. Kern & Sohn (Albstadt)

Zentrifugen

Tischzentrifugen:

Mikroliter (Typ 2020), Hettich (Tuttlingen)
Micro 24-48 (Typ 1001), Hettich (Tuttlingen)

Kühlzentrifuge:

BR4i (verwendete Rotoren: AB 1.14, AB 50.10), Jouan (Unterhaching)
J2HS (verwendeter Rotor: JLA 10.500), Beckman (München)

Ultraschallgerät

T 460, Elma Transsonic (Singen/Htw.)

Rotationsverdampfer

Heidolph VV 2000, WB 2000 (Kehlheim)

Ultraturrax

Ultraturrax T500, IKA-Labortechnik (Staufen)

Geräte für mikrobiologische Arbeiten

Autoklav

Varioclav Dampfsterilisator (Typ 500), H+P Labortechnik (Fachhandel Labotec, Wiesbaden)

Brutschränke

BE 400, Memmert (Schwalbach)

BE 500, Memmert (Schwalbach)

Sterilbank

Horizontal Laminar Flow Workstation, Microflow, MDH (Hampshire, UK)

Inkubationsschüttler

KS15 (Schüttelmaschine) und TH 15 (Inkubationshaube), Edmund Bühler, Johanna Otto GmbH (Hechingen)

Kulturrad

Rotator, H. Saur Laborbedarf (Reutlingen)

Geräte für molekulargenetische Arbeiten

Geldokumentationsanlage

GelDoc 1000 Single Wavelength Mini-Transilluminator, Bio-Rad (München)

Software *Molecular Analyst*, Bio-Rad (München)

Heizblock

Techne Dri-Block DB-2D, Techne (Cambridge, UK)

Thermocycler

Genius-02 T, Techne (Cambridge, UK)

UV-Lampe

Handlampe (254 und 312 nm), H. Saur Laborbedarf (Reutlingen)

Vakuumzentrifuge

Vakuum Concentrator Mini-30, Bachofer (Reutlingen)

Geräte zur Proteinuntersuchung

Durchflußthermostat

Ministat kompatibel control, Huber (Offenburg)

Fluoreszenzspektroskop

Fluoromax-2 und Tieftemperatureinheit, ISA Jobin-Yvon-Spex (Grasbrunn)

Analysesoftware *Datamax*, V. 2.24, AISN, ISA Jobin-Yvon-Spex (Grasbrunn)

CD-Spektroskop

Jasco J-810S Spektralpolarimeter, Jasco CDF-426S Peletier-Element, Jasco (Groß-Umstadt)

Ultrazentrifugen

Optima XL-100K (Rotor: SW 41 Ti), Beckman (München)

Centrikon T-1065 (Rotor: TST 41.14), Kontron (Neufahrn)

HPLC (*high-pressure-liquid-chromatography*)

Kontron Instruments (Neufahrn):

Gradientenmischer: Model 425

Pumpe: Model 420

Detektor: Diodenarray Detektor 440

Software: *Kroma System 2000*

Photometer

Shimadzu SPD-6AV (Kyoto, Japan)

Vorsäule

LiCrospher RP-8.5 μm , 20 x 4.6 mm, Mainzer Analysetechnik (Mainz)

RP-Säule

Inertsil C, 5 μm , 150 x 4.6 mm, Mainzer Analysetechnik (Mainz)

Filter

X-101A, 2 μm , 0.62" x 6.62" x 250, Upsearch Scientific (Oak Harbor, USA)

Mikrotiterplatten-Reader

Spectra Max plus, Molecular Devices Corporation (Sunnyvale, USA)

Elektrophoresekammer

Hoefer Mighty Small, Hoefer Pharmacia (San Francisco, USA)

Kocher

HB4 basic Heizbad, IKA-Labortechnik (Staufen)

Scanner

Epson GT-7000, Epson GmbH Deutschland (Düsseldorf)

2.3 Bakterienstämme

Die folgenden zwei *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme (Stratagene, Heidelberg) wurden in dieser Arbeit verwendet:

JM 101: supE, thi-1, $\Delta(\text{lac-proAB})$ [F' traD36, proAB, lacI^q, Z Δ M15]

SCS 110: RpsL, (Str^r), thr, leu, endA, thi, lacY, galK, galT, ara, tonA, tsx, dam, dcm, supE44, $\Delta(\text{lac-proAB})$ [F' traD36, proAB, lacI^q, Z Δ M15]

2.4 Größenstandards für Gelelektrophoresen

2.4.1 DNA-Marker

In dieser Arbeit wurden die folgenden zwei Marker zur Bestimmung von DNA-Fragmentgrößen verwendet. Der 100 bp Marker wurde bei New England Biolabs (NEB, Schwalbach) erworben, der 1 kb Marker stammt von Gibco BRL Life Technologies (Eggenstein).

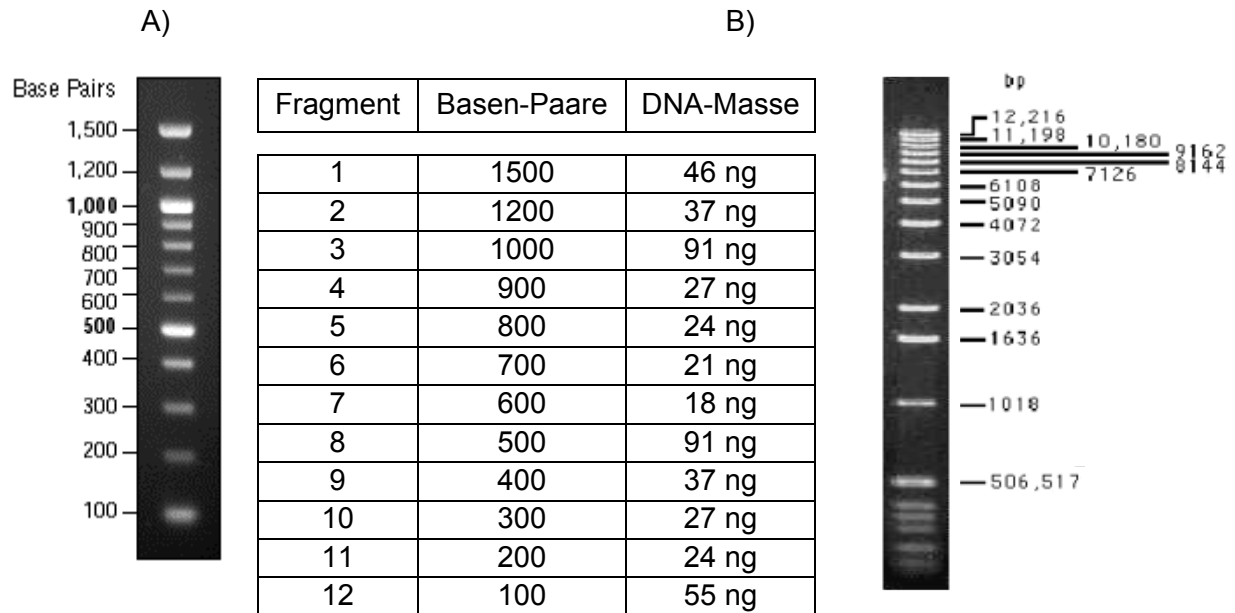


Abb. 2.4-1: Verwendete Marker zur Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten bei elektrophoretischer Agarosegelaufreinigung. A) 100 bp Marker (NEB). Gezeigt ist die elektrophoretische Auftrennung sowie die Tabelle über Fragmentgröße und Menge der DNA. Durch die bekannten DNA-Mengen konnte mit dem Marker eine Abschätzung der Menge vorgenommen werden. B) Elektrophoretisches Auftrennungsmuster des 1 kb Marker (Gibco BRL Life Technologies).

Von den Markern, die auf eine Konzentration von 100 µg/µl eingestellt wurden, wurden jeweils 5 µl pro Bahn aufgetragen. Der 100 bp Marker wurde mit 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) und 0.1 mM EDTA, der 1 kb Marker mit 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl und 0.1 mM EDTA entsprechend verdünnt.

2.4.2 Proteinmarker

Zur Bestimmung der Molekulargewichte von denaturierten Proteinen aus Einschlußkörperisolierungen durch Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurde der SDS-7 Marker von Sigma (Deisenhofen) verwendet:

Rinderserumalbumin	66.0 kDa
Ovalbumin	45.0 kDa
NADPH	36.0 kDa
Carboanhydrase	29.0 kDa
Trypsinogen	24.0 kDa
Trypsin-Inhibitor	20.1 kDa
α-Lactalbumin	14.2 kDa

2.5 Expressionsplasmid

Für die bakterielle Überexpression der Gene *lhca1* und *lhca4* und ihrer Mutanten wurde der Bakterien-Expressionsvektor pDS12/RBSII (Bujard et al., 1987) verwendet (Abb. 2.5-1). Die Überexpression ist durch IPTG-Gabe induzierbar. Da der Vektor das β-Lactamase Gen trägt,

ist eine Selektion von Bakterienzellen, die durch Plasmidaufnahme über eine Ampicillinresistenz verfügen, möglich.

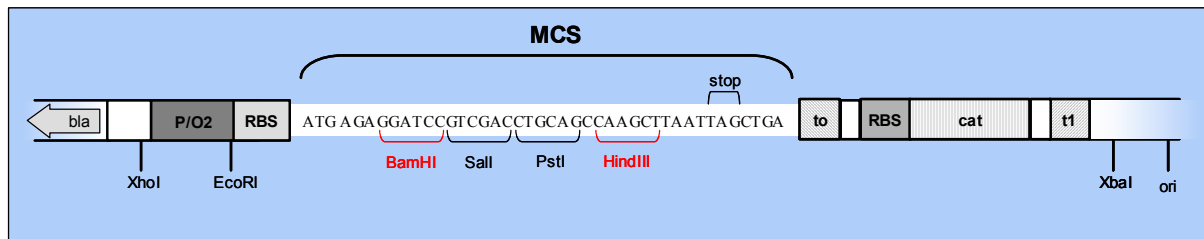


Abb. 2.5-1: Schematische Darstellung des pDS12/RBSII Expressionsvektors: P/O = Promotorregion (T5-Promotor P_{N25}), die unter Kontrolle des lac-Repressors (*lac i*) steht, der durch IPTG induziert werden kann; bla = β -Lactamase Gen; ori = origin of replication; t_0 = Terminationsregion; cat = Gen für Chloramphenicol-Transferase; RBS = Ribosomenbindestelle; MCS = *multiple cloning site*.

2.6 Klone

Für diese Arbeit wurden die in Schmid et al. (1997) beschriebenen *lhca1* und *lhca4* Vektor-Konstrukte als Ausgangsmaterial verwendet. Beide cDNAs wurden zwischen die *BamHI*- und *HindIII*-Schnittstelle in die *multiple cloning site* (MCS) des pDS12/RBSII (Kap. 2.5) ligiert.

Die im Verlauf dieser Arbeit hergestellten Mutanten, die Primer zu ihrer Generierung und ihre Eigenschaften sind im Anhang (A.1) zusammenfassend dargestellt. Die DNA- und Aminosäuresequenzen von *Lhca1* und *Lhca4* befinden sich im Anhang A.2.

2.7 Tomaten zur Isolierung von Gesamtpigmentextrakt

Der für die Rekonstitutionen verwendete Gesamtpigmentextrakt wurde aus Thylakoiden von Tomatenblättern (*Lycopersicon esculentum*) der Sorte *Polaris F1 Hybrid* (Samen Barnsdorf, Mainz) gewonnen (Kap. 3.3.4).

Die Pflanzen wurden bei 22 °C unter Langtagbedingungen, d.h. 16 h Licht, 8 h Dunkelheit, bei einer Lichtintensität von $80 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Leuchtstoffröhren L 36W/20 hellweiß; Osram, Berlin) vier Wochen lang angezogen. Die Tomatenpflanzen erhielten einmal pro Woche Dünger (Blütenpracht-Dünger, Plus), der entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt wurde.

3 Methoden

3.1 Methoden der Mikrobiologie

Alle verwendeten Lösungen wurden vor ihrer Benutzung autoklaviert. Wenn nicht anders angegeben diente steriles H₂O_{dest.} als Lösungsmittel.

3.1.1 Bakterienanzucht

Als Wirte der pDS12RBSII Expressionsvektoren wurden zwei *Escherichia coli* Stämme verwendet. Im Stamm JM 101 wurden die mutierten cDNAs überexprimiert und alle Klonierungswege beschriften (Kap. 2.3). Transformationen in SCS 110-Zellen waren für die Fälle notwendig, in denen mit dam- (DNA-Adenin-Methylierung) oder dcm- (DNA-Cytosin-Methylierung) sensitiven Restriktionsenzymen geschnitten werden musste, da dieser Stamm keine DNA-methylierenden Enzyme besitzt (Kap. 2.3). SCS 110-Zellen eignen sich allerdings nicht für die Überexpression von Proteinen, so daß zur Einschlußkörpergewinnung immer eine Transformation des Plasmids in JM 101 nötig war (Ausubel et al., 1995).

Beide Stämme wurden unter gleichen Bedingungen angezogen. Man benötigt Luria Bertrani-Flüssigmedium (LB-Medium; 1% (w/v) Trypton, 1% (w/v) NaCl, 0.5% (w/v) Hefe Extrakt, mit NaOH erfolgt die Einstellung auf pH 7.5) und inkubiert die Zellansätze bei 37 °C und 175 Upm. Zur Selektion wurde, wenn nötig, Ampicillin (100 µg/ml) zugesetzt, nachdem das Medium auf mindestens 50 °C abgekühlt war (Ausubel et al., 1995).

Für das Vereinzeln von Bakterienzellen wurden Zellsuspensionen auf LB-Agar Platten ausplattiert. Hierzu wurde dem LB-Medium 1.5% (w/v) Agar und, zur Selektion plasmid-tragender Zellen, 100 µg/ml Ampicillin zugegeben.

3.1.2 Herstellung kompetenter *E. coli* Bakterienzellen

Wenn Bakterien in Anwesenheit hoher Ionen-Konzentrationen gewachsen sind und anschließend bei 0 °C mit CaCl₂ behandelt werden, wird die Bakterienzellwand für die Aufnahme ringförmiger DNA passierbar. Es wird diskutiert, daß das bei der Herstellung kompetenter Zellen anwesende CaCl₂ die DNA an der Oberfläche der Bakterienzelle bindet. Niedrige Temperaturen konservieren den durchlässigen Zustand der Zellmembran. Ein Hitzeschock, der für jeden Bakterienstamm spezifisch ist und optimiert werden muß, vermittelt die Aufnahme der DNA durch die Membran. Allerdings ist der genaue Mechanismus dieses Phänomens nicht bekannt (Heinemann, 1999).

JM101-Zellen wurden auf einer LB-Agar Platte mit 10 mM MgCl₂ ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von der Platte wurde eine einzelne Kolonie entnommen und für 4-5 h in 100 ml TYM BROTH (2.0% (w/v) Trypton, 0.5% (w/v) Hefe-Extrakt, 0.1 M NaCl, 0.01 M MgCl₂, mit NaOH auf pH 7.5 eingestellt) auf dem Schüttelinkubator angezogen (200 Upm, 37 °C) bis eine OD₅₅₀ von 0.8-0.9 erreicht war. Um eine vorsichtige Pelletierung zu erlangen, wurden die Zellen im Anschluß mit 1000 g bei 4°C für 12 min sedimentiert. Der Überstand wurde sorgfältig dekantiert, das Pellet auf Eis vorsichtig mit 30-40 ml Tfb I (30 mM

KOAc, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 15% (w/v) Glycerin, 50 mM ⁸MnCl₂) suspendiert und für 20 min dort belassen. Danach wurde die Zellsuspension wiederum mit 1000 g bei 4 °C für 8 min sedimentiert und das Pellet mit 4 ml Tfb II (75 mM CaCl₂, 10 mM Na-MOPS (pH 7.0), 10 mM KCl, 15% (w/v) Glycerin) vorsichtig wieder in Lösung gebracht. Die Suspension wurde unter ständiger Kühlung unmittelbar in 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert (Kosemund, 1999).

3.1.3 Herstellung von Dauerkulturen

Durch Zugabe von Glycerin wird verhindert, daß durch den Gefriervorgang auftretende Eiskristalle die Bakterien zerstören. Zu 4 ml einer *E. coli* Übernachtskultur in LB (+100 µg Ampicillin/ml) wurden unter Schwenken des Kulturröhrchens 706 µl reines, steriles Glycerin dazupipettiert. Das Röhrchen wurde anschließend noch etwas geschwenkt (nicht vortexen) bis eine homogene Lösung entstanden ist. Diese wurde in 1 ml Aliquots bei -80 °C eingefroren und gelagert (Sambrook et al., 1989).

So können *E. coli*, die z.B. Plasmide mit modifizierten *cab*-Genen tragen, für längere Zeit aufbewahrt werden.

3.2 Herstellung von rekombinanten Lhca1 und Lhca4 Proteinen

Die für die Untersuchungen zur Rekonstitution der monomeren Untereinheiten und der Assemblierung dieser zum dimeren LHCI-730 verwendeten Apoproteine wurden auf DNA-Ebene modifiziert. In diesem Kapitel werden zuerst gängige Methoden der Molekulargenetik und im Anschluß die Verfahren zur Veränderung der DNAs von *lhca1* und *lhca4* mittels PCR-Mutagenese beschrieben.

3.2.1 Allgemeine molekulargenetische Methoden

3.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren verwendet man Agarosegele (Ausubel et al., 1995). In einem elektrischen Feld wird DNA entsprechend der Größe als scharfe Bande konzentriert, wenn der pH-Wert größer als 5 ist. Die Konzentration der Gelmatrix wird abhängig von der zu erwartenden DNA-Länge gewählt (Tab. 3.2-1). Je größer die Fragmente um so niedriger die Agarosekonzentration.

Tab. 3.2-1: Korrelation DNA-Fragmentlänge und Agarosekonzentration.

Länge [bp]	Agarosekonzentration [%]	Elektrophoresbedingungen [V]
4500 – 1500	0.8	80
1500 – 500	1.5	100
500 – 100	2.0 – 2.5	120

⁸ MnCl₂ getrennt von der Lösung mit den anderen Bestandteilen autoklavieren und nach Abkühlung der Lösungen hinzufügen.

Die DNA-Auftrennung im Agarosegel diente mehreren Zwecken: Nach den PCR-Läufen zur Herstellung der Mutanten mußte das Produkt auf unerwünschte und unerwartete Amplifikate überprüft werden. In weiteren Schritten der Aufreinigung und Klonierung der PCR-Produkte war eine Quantifizierung, die mit dem verwendeten 100 bp Standard durchgeführt werden konnte, und Qualitätsprüfung der DNA notwendig. Ebenso wurden auf diesem Wege die DNA-Restriktionen überprüft.

Die Agaroselösung wurde vor Verwendung in der Mikrowelle in TAE-Puffer (40 mM Tris, 2 mM EDTA, konzentrierte Essigsäure, pH 8.5) gelöst und nach kurzer Abkühlphase, bei der das Material gleichmäßig in Lösung bleiben mußte, auf einen Gelträger gegossen und zur Bildung von Taschen mit einem Kamm versehen. Die DNA-Proben wurden 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) beschwert und angefärbt und anschließend in die Taschen des kalten, erstarrten Gels pipettiert. Als Laufpuffer diente ebenfalls TAE. Die Anfärbung der DNA-Banden mit Ethidiumbromid erfolgte nach Beendigung des Gellaufes für 5 min in einem Färbebad (5µg Ethidiumbromid pro ml H₂O_{dest.}) auf einem Gelschüttler. Unspezifische Anfärbung der Gelmatrix wurde in einem Wasserbad für 15 min entfernt. Die Dokumentation erfolgte mit der Geldokumentationsanlage Gel Doc 1000 (BioRad, München) bei einer Anregungswellenlänge von 312 nm. Das Fluoreszenzlicht des Ethidiumbromids wurde bei 590 nm detektiert und mit Hilfe der Software „Molecular Analyst“ (BioRad, München) ausgewertet. Von den in 2.4.1 aufgelisteten DNA-Standards wurden jeweils 500 ng eingesetzt.

3.2.1.2 Plasmid-Isolierung

Zur selektiven Isolierung von Plasmiden aus Bakterienzellen wurden im Handel erhältliche Komplett-Systeme verwendet. Für Präparationen im kleineren Maßstab (Übernachtkultur von 3 ml, DNA-Mengen < 10 µg) wurde das *Wizard Plus DNA Purification System* (Promega, Mannheim) benutzt und nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Um DNA-Mengen in der Größenordnung von maximal 100 µg zu erhalten fand das *NUCLEOBOND[®] AX* mit *AX 100 Säulen* (Macherey-Nagel, Düren) Verwendung. Die Vorgehensweise entsprach der Beschreibung im Protokoll. Für die Präparation war eine große Kulturmenge von 100 ml notwendig, da es sich bei dem verwendeten pDS-Plasmid um ein sogenanntes „low-copy plasmid“ handelt, d.h. der Vektor liegt nur in geringer Kopienzahl in der Bakterienzelle vor.

3.2.1.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Gewinnung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des *E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit* (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) oder dem *Nucleotrap[®] Extraction Kit* (Macherey-Nagel, Düren). Die Durchführung folgte den Anweisungen in den Protokollen. Die DNA wurde abschließend in 35 µl sterilem H₂O_{dest.} gelöst.

3.2.1.4 DNA-Aufreinigung

Eine schnelle und effiziente Methode zur Gewinnung von DNA aus einer Lösung unter Entfernung von Puffer-Salzen und Denaturierung von Proteinen ist das Ausfällen mit Alkohol.

Dabei wird der DNA durch den Alkohol das Wasser entzogen, die Nukleinsäure fällt aus und läßt sich durch Zentrifugation pelletieren. Es wurden zwei Methoden mit unterschiedlichen Anwendungszielen verwendet.

Die **Isopropanol-Fällung** wurde zur Gewinnung des Produktes nach PCR zur Herstellung von Deletions- und Punktmutanten verwendet. Die Fällung wurde nach folgendem Protokoll unter Verwendung der angegebenen Reagentien durchgeführt:

PCR-Produkt + H ₂ O _{dest.}	ad 150 µl
Ammoniumacetat (4 M)	150 µl
Isopropanol	300 µl

Nach Mischen der Lösungen und Zentrifugation für 45 min (bei 4 °C und 16000 g) wurde der Überstand anschließend vorsichtig abgezogen und das Pellet mit 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen (Zentrifugation 10 min, 4 °C, 16000 g). Im Anschluß wurde der Überstand wiederum vorsichtig entfernt und das Pellet für 10 min in der Speed Vac (mit Heizung) getrocknet. Die von Lösungsmittel befreite und trockene DNA wurde in 10 µl sterilem H₂O_{dest.} gelöst.

Zur Fällung von PCR-Sequenzierprodukt wurde eine **Ethanol-Fällung** mit folgenden Komponenten verwendet:

PCR-Produkt	20 µl
Na-Acetat (3 M)	3 µl
Ethanol _{abs.}	50 µl

Die Lösungen wurden gemischt, 5 min bei -80 °C eingefroren (alternativ: in flüssigem Stickstoff) und sofort zentrifugiert (30 min, 4 °C, 16 000 g). Nach vorsichtigem Dekantieren des Überstandes wurde anschließend das Pellet mit 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen (Zentrifugation 10 min, 4 °C, 16000 g), der Überstand wiederum vorsichtig abgezogen, verworfen und das Pellet 10 min in der Speed Vac (mit Heizung) getrocknet.

3.2.1.5 DNA-Quantifizierung

Größere DNA-Mengen wurden photometrisch bestimmt und nach nach folgender Formel berechnet:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g DNA/ml}] = (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{320}) \cdot {}^950 \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

Kleinere Mengen wurden durch Vergleich mit einer definierten Menge des verwendeten 100 bp Standard im Agarosegel quantifiziert. Das hatte den Vorteil die Probe gleichzeitig auch charakterisieren zu können.

3.2.1.6 Restriktion von DNA

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Restriktion von DNA zur Klonierung von Genen und für die Kontrolle von Gen- und Aminosäureeinbau verwendet.

⁹ Die Zahl „50“ ist der Faktor für doppelsträngige DNA.

Tabelle 3.2-2: Überblick über die verwendeten Restriktionsenzyme und Puffer. Alle Enzyme hatten bei 37 °C ihr Temperaturoptimum. N = jede beliebige Base ist möglich; ▼ symbolisiert die Position des Schnittes.

Enzym	Hersteller	Erkennungssequenz	Puffer
<i>BamH I</i>	NEB	G▼GATCC	<i>BamH I</i> / 1.5 x OPA
<i>Dra III</i>	NEB	CACNNN▼GTG	NEB3
<i>EcoR I</i>	Pharmacia	G▼AATTC	2 x OPA
<i>Hind III</i>	NEB	A▼AGCTT	NEB2 / <i>BamH I</i>
<i>Hind III</i>	Pharmacia	A▼AGCTT	1.5 x OPA
<i>Nco I</i>	NEB	C▼CATGG	NEB4
<i>Pvu II</i>	Gibco-BRL	CAG▼CTG	REact6
XbaI	Pharmacia	T▼CTAGA	OPA
<i>Xmn I</i>	NEB	GAANNNN▼TTC	NEB2

Die Restriktion folgte im allgemeinen den Anleitungen der Hersteller (NEB, Schwalbach; Pharmacia, Freiburg). Die Tabelle 3.2-2 gibt einen Überblick über alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme. Die Enzyme benötigen für eine optimale Aktivität spezifische Puffer (Tab. 3.2-3). Bei Angabe von zwei verschiedenen Puffern war eine alternative Verwendung, z.B. bei Doppelverdauen, möglich. Alle Enzyme hatten ihr Temperaturoptimum bei 37 °C.

Tab. 3.2-3: Puffer-Zusammensetzungen für die verwendeten Restriktionsenzyme (Ac, Acetat; DTT, Dithiothreitol).

Puffer	Zusammensetzung
NEB2	50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
NEB3	100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
NEB4	50 mM KAc, 20 mM Tris-Ac (pH 7.9), 10 mM MgAc, 1 mM DTT
NEB <i>BamH I</i>	150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
One-Phor-All+ (OPA+)	50 mM KAc, 10 mM Tris-Ac (pH 7.5), 10 mM MgAc, 1 mM DTT
REact6	50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 6 mM MgCl ₂ , 50 mM NaCl, 50 mM KCl

Restriktion der PCR-Produkte zur Klonierung in den Vektor

Da die beiden zu Anfang dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme *BamH I* und *Hind III* von zwei verschiedenen Herstellern stammten (s. Tabelle 3.2-1), wurde die Prozedur von den Herstellerangaben abgewandelt. Als Puffer wurde OPA (Pharmacia) in 1.5 facher Konzentration verwendet. Um einen vollständigen Verdau zu gewährleisten, der für eine effektive Ligation in den Vektor nötig ist, wurden die Enzyme in größeren Mengen eingesetzt. Für die Restriktion von 1 µg DNA wurde mindestens für 3 Stunden, meistens über Nacht, bei 37 °C verdaut:

gereinigtes PCR-Produkt	entsprechend 1 µg
One Phor All Puffer (10x)	1.5 fach
<i>BamH I</i>	6 U (Unit ¹⁰)
<i>Hind III</i>	6 U
H ₂ O _{dest.}	ad 15 µl

3.2.1.7 Ligation

Das durch Restriktion mit *BamH I* und *Hind III* hergestellte Produkt aus der PCR-Amplifikation wurde mittels Isopropanol-Fällung gereinigt und über eine Gelaufreinigung der Erfolg der Restriktion überprüft. Gleichzeitig wurde das Produkt quantifiziert (Kap. 3.2.1.5). Für die folgende Ligation wurden 25 ng des gereinigten Restriktionsproduktes mit 75 ng des mit den selben Enzymen aufgeschnittenen Expressionsplasmid ligiert. Das entspricht in etwa einem molaren Verhältnis von 2:1 (Insert:Vektor):

gereinigtes Restriktionsprodukt	25 ng
aufgeschnittener Vektor	75 ng
T4-Ligase-Puffer (10X)	1 fach
T4-Ligase	1 µl
H ₂ O _{dest.}	ad 10 µl

Die Ligation erfolgte für mindestens 3 Stunden oder über Nacht bei 16 °C bzw. 4 °C.

3.2.1.8 Transformation

2.5 µl aus dem 10 µl Ligationsansatz (10 ng DNA/µl) wurden zu 50 µl, auf Eis aufgetauten, kompetenten *E. coli* Zellen (Stämme: JM101 oder SCS110; Kap. 2.3) pipettiert. Eine Mischung von DNA und Zellen erfolgte durch leichtes anstupfen des Reaktionsgefäßes. Der Ansatz wurde anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Um die DNA-Aufnahme der Bakterien effizienter zu machen, wurden die Zellen mit einem 5 minütigen Hitzeschock bei 22 °C (JM101) bzw. 45 sek bei 37 °C (SCS110) behandelt. Damit die Bakterien sich vermehren und nach Plasmidaufnahme Resistenz-Proteine exprimieren konnten, wurden sie nach Zugabe von 225 µl auf 37 °C vorgewärmten LB-Medium ohne Ampicillin für eine Stunde bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Jeweils 100 µl der transformierten Zellen wurden auf LB-Ampicillin-Agar Platten (Kap. 3.1; Durchmesser: 9 cm) ausplattiert und auf dem Kopf liegend bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zur weiteren Bearbeitung wurden Kolonien ausgewählt und einzeln in LB-Medium mit Ampicillin überführt.

3.2.1.9 Kontrolle durch Restriktion und Sequenzierung

Restriktion

Um die Plasmide vor weiteren Schritten auf den richtigen Einbau der modifizierten DNAs zu untersuchen und um über eine Selektionsmethode positiver Klone vor der Sequenzierung zu verfügen, wurden die isolierten Plasmide mit den beiden Insert-flankierenden Restriktionsschnittstellen *BamH I* und *Hind III* geschnitten und ihre Größe in einen

¹⁰ Def. Unit: 1U = Menge an Enzym, die benötigt wird, um 1 µg λ-DNA bei optimaler Temperatur in einer Stunde vollständig zu verdauen.

Agarosegel überprüft. Die Plasmid-DNA für diese Kontrolle stammt aus der Mini-Präparation (Kap. 3.2.1.2). Ein 15 µl Restriktionsansatz sah typischerweise so aus:

DNA aus Mini-Präparation	12.15 µl (entspricht etwa 1 µg)
Restriktionspuffer (OPA+)	2.25 µl (1.5 fach)
<i>BamH I</i>	6 U
<i>Hind III</i>	6 U
H ₂ O _{dest.} steril	ad 15 µl

Der Verdau erfolgte für mindestens drei Stunden bei 37 °C. Im Anschluß erfolgte eine Auftrennung im Agarosegel. Es wurden 10 µl des Restriktionsansatzes pro Bahn eingesetzt. Die Größe der DNA-Fragmente lag bei 603 bp für den *lhca1* bzw. 600 bp für den *lhca4* abzüglich der deletierten Basen.

Als zeitsparende Alternative zur Restriktion wurde eine PCR durchgeführt, deren Matrizen-DNA aus Bakterienzellen ohne vorherige Plasmidpräparation stammte. Dabei macht man sich zunutze, daß die Zellen bei den hohen Denaturierungstemperaturen im PCR-Zyklus zerstört werden. Das Insert wurde mittels der Sequenzierungsprimer amplifiziert. Folgende Komponenten wurden verwendet:

DNA	Bakterienzellen
dNTPs (je 25 mM)	2 µl
Primer, vorwärts (pDS12+) (10 µM)	2 µl
Primer, rückwärts (pDS12-) (10 µM)	2 µl
Polymerase-Puffer	5 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (2.5 U)	1 µl
H ₂ O _{dest.}	38 µl

Die Zellen wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von einer LB-Agar-Platte gepickt und in den fertigen PCR-Ansatz getaucht, für eine Über-Nacht-Kultur wurde die Spitze in 5 ml LB+Ampicillin geworfen. Um die Zerstörung der Bakterienzellen sicherzustellen, wurde die Denaturierungsphase der PCR verlängert. In Tabelle 3.2-4 ist das Cyclyer-Protokoll dargestellt.

Tab. 3.2-4: Cyclyer-Protokoll zur Amplifizierung von *lhca*-Insert aus Bakterienzellen.

Schritt	Zyklenzahl	Temperatur [°C]	Dauer [min]
Denaturierung	1	94	5
Denaturierung	35	94	1
Annealing		54	1
Amplifizierung		72	1
Amplifizierung	1	72	7

Bei den Punktmutanten konnte man sich die zusätzlich zum Basenaustausch gelöschten Schnittstellen zunutze machen und die Klone auf die zu erwartenden Fragmentgrößen untersuchen (Kap. 3.2.2.2). Die Modifikation der DNA, durch den Mutageneseprimer eingefügt, hatte keinen Einfluß auf die Aminosäuresequenz.

Der Mutageneseprimer für den Aminosäureaustausch am N-Terminus des *Lhca1* modifizierte das im *lhca1* vorhandene *Pvu II*-Kodon, so daß das Enzym an dieser Stelle nicht mehr schneiden konnte. In einem Restriktionsverdau mit *Hind III* und *Pvu II* schneidet somit

nur noch *Hind III*, was ein lineares Fragment in der Gelaufftrennung zur Folge hat (Tab. 3.2-5).

Im *lhca4* wurde am N-proximalen Ende das Kodon für eine vorhandene *Xmn I*-Schnittstelle gelöscht. Auf dem pDS-Vektor ist allerdings noch eine *Xmn I*-Stelle vorhanden, so daß bei einem Verdau der Punktmutanten mit *Hind III* und *Xmn I* noch zwei Fragmente im Gel nachweisbar sein sollten (Tab. 3.2-5).

Tab. 3.2-5: Restriktionsmuster des Kontrollverdau der N-terminale Punktmutanten des *lhca1* und des *lhca4*.

Funktion	Geschnitten mit ...	zu erwartende Fragmente [bp] ...	
<i>lhca1</i>			
Kontrolle (<i>lhca1</i> in Vektor)	<i>Hind III</i> und <i>Pvu II</i>	272 3736	<i>Pvu II</i> und <i>Hind III</i> <i>Hind III</i> und <i>Pvu II</i>
Punktmutanten	<i>Hind III</i> und <i>Pvu II</i>	4008	Lineares Fragment (nur <i>Hind III</i> schneidet)
<i>lhca4</i>			
Kontrolle (<i>lhca4</i> in Vektor)	<i>Xmn I</i> und <i>Hind III</i>	489 634 2882	<i>Xmn I</i> (<i>lhca4</i>), <i>Hind III</i> <i>Xmn I</i> (Vektor), <i>Xmn I</i> (<i>lhca4</i>) <i>Hind III</i> , <i>Xmn I</i> (Vektor)
Punktmutanten	<i>Xmn I</i> und <i>Hind III</i>	1123 2882	<i>Xmn I</i> (Vektor), <i>Hind III</i> <i>Hind III</i> , <i>Xmn I</i> (Vektor)

Durch den Mutageneseprimer wurde am 3'-Ende des *lhca1* eine *Nco I*-Schnittstelle gelöscht. Da bereits im Vektor und im *lhca1* *Nco I*-Kodons vorhanden waren, ergab sich ein komplexes Bandenmuster, dessen Verteilung in Tabelle 3.2-6 dargestellt ist.

Am 3'-Ende des *lhca4* wurde ein *Dra III*-Kodon gelöscht. Da keine weiteren Erkennungssequenzen für dieses Enzym vorhanden waren, ergab sich ein lineares Fragment für die Punktmutanten bei einem Verdau mit *BamH I* und *Dra III*.

Tab. 3.2-6: Restriktionsmuster der C-terminalen *lhca1*- und *lhca4*-Punktmutanten.

Funktion	Geschnitten mit ...	zu erwartende Fragmente [bp] ...	
<i>lhca1</i>			
Kontrolle (<i>lhca1</i> in Vektor)	<i>BamH I</i> und <i>Nco I</i>	276 282 727 2723	<i>BamH I</i> und <i>Nco I</i> (1) <i>Nco I</i> (1) und <i>Nco I</i> (2) <i>Nco I</i> (2) und <i>Nco I</i> (3) <i>Nco I</i> (3) und <i>BamH I</i>
Punktmutanten	<i>BamH I</i> und <i>Nco I</i>	276 1009 2723	<i>BamH I</i> und <i>Nco I</i> (1) <i>Nco I</i> (1) und <i>Nco I</i> (3) <i>Nco I</i> (3) und <i>BamH I</i>

Funktion	Geschnitten mit ...	zu erwartende Fragmente [bp] ...	
<i>lhca4</i>			
Kontrolle (<i>lhca4</i> in Vektor)	<i>BamH I</i> und <i>Dra III</i>	521 3484	<i>BamH I</i> und <i>Dra III</i> <i>Dra III</i> und <i>BamH I</i>
Punktmutanten	<i>BamH I</i> und <i>Dra III</i>	4005	Linearisierter Vektor, da nur <i>BamH I</i> schneidet

Im folgenden werden die Zusammensetzungen der einzelnen Restriktionsansätze aufgeführt. Alle Restriktionen wurden im Anschluß durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Kap. 3.2.1.1). Um ausreichend Material für die Auftrennung zur Verfügung zu haben, wurde immer das komplette Volumen aufgetragen. Die Kontroll-Restriktion der N-terminalen Punktmutanten des *lhca1* mußte wegen nicht miteinander vereinbar spezifizierter Pufferbedingungen der beiden verwendeten Restriktionsenzyme in zwei Schritten hintereinander durchgeführt werden. Restriktion 1 hatte folgende Zusammensetzung:

DNA	1 µg entsprechendes Volumen
REact6-Puffer	1-fach
<i>Pvu II</i>	1 U
H ₂ O _{dest.} steril	ad 15 µl

Die Restriktion erfolgte für 3 h bei 37 °C. Das Produkt wurde durch Isopropanol-Fällung (Kap. 3.2.1.4) gereinigt und komplett für die zweite Restriktion verwendet:

DNA	Pellet aus Isopropanol-Fällung
NEB2	1-fach
<i>Hind III</i>	6 U
H ₂ O _{dest.} steril	ad 15 µl

Die *lhca4*-Klone für die N-terminalen Aminosäureaustausche wurden durch eine Restriktion in einem Schritt auf ihre Sequenzveränderung überprüft:

DNA	1 µg entsprechendes Volumen
NEB2	1-fach
BSA ¹¹	1-fach
<i>Hind III</i>	6 U
<i>Xmn I</i>	1 U
H ₂ O _{dest.} steril	ad 15 µl

Die Kontrolle für die C-terminalen Punktmutanten des *lhca1* mußte in zwei Schritten durchgeführt werden. Restriktion 1 dauerte 3 h und wurde bei 37 °C inkubiert:

DNA	1 µg entsprechendes Volumen
NEB4	1-fach
<i>Nco I</i>	3 U
H ₂ O _{dest.} steril	ad 15 µl

Nach Isopropanol-Fällung folgte die zweite Restriktion mit *BamH I*. Die Reaktion wurde ebenfalls für 3 h bei 37 °C inkubiert:

¹¹ BSA = bovine serum albumine

DNA	Pellet aus Isopropanol-Fällung
NEB <i>BamH I</i>	1-fach
<i>BamH I</i>	6 U
H ₂ O _{dest.} steril	ad 15 µl

Ebenfalls an C-terminaler Position mußte auch beim *lhca4* die Restriktion in zwei Schritten durchgeführt werden. Der erste Verdau erfolgte bei 37 °C über Nacht:

DNA	1 µg entsprechendes Volumen
NEB <i>BamH I</i>	1-fach
<i>BamH I</i>	6 U
H ₂ O _{dest.} steril	ad 15 µl

Die zweite Restriktion schloß sich der Isopropanol-Fällung an, dauerte 3 h und wurde bei 37 °C inkubiert:

DNA	1 µg entsprechendes Volumen
NEB3	1-fach
BSA	1-fach
Dra III	6 U
H ₂ O _{dest.} steril	ad 15 µl

Sequenzierung

Um den korrekten Einbau von Deletions- und Punktmutanten, aber auch die korrekte Amplifizierung durch die *Pfu*-Polymerase zu kontrollieren, wurden die zuvor ausgewählten Mutanten sequenziert.

Die Matrizen-DNA für die Sequenzierung stammte entweder aus einer Plasmidpräparation (Kap. 3.2.1.2) oder aus einer Amplifizierung mittels PCR. Die dafür verwendete Matrize stammt aus einer Mini-Plasmid-Präparation. Die Zusammensetzung der Ansätze war wie folgt:

Matrizen-DNA	2.5 µl
dNTPs (je 25 mM)	2 µl
Primer, vorwärts (pDS12+) (10 µM)	2 µl
Primer, rückwärts (pDS12-) (10 µM)	2 µl
Polymerase-Puffer	5 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (2.5 U)	1 µl
H ₂ O _{dest.}	35.5 µl

Die Amplifizierung erfolgte mittels der Sequenzierungsprimer (Tab. 3.2-8) nach folgendem Cycler-Protokoll (Tab. 3.2-7):

Tab. 3.2-7: Cycler-Protokoll zur Amplifizierung des Inserts für nachfolgende Sequenzierung.

Schritt	Zyklenzahl	Temperatur [°C]	Dauer [min]
Denaturierung	1	94	3
Denaturierung	35	94	1
Annealing		54	1
Amplifizierung		72	1
Amplifizierung	1	72	7

Für die folgende Sequenzier-PCR wurden ca. 500 ng der DNA eingesetzt. Dabei wurde pro Reaktion immer nur ein Primer verwendet, um die Einsträngigkeit der DNA zu gewährleisten.

Tab. 3.2-8: Primer zur Sequenzierung der *lhca* Inserts in pDS12/RBSII.

Primer	Basenabfolge
pDS12+	5' ATT TGC TTT GTG AGC 3'
pDS12-	5' ACC GAG CGT TCT GAA 3'

Beide Primer sind homolog zu Sequenzabschnitten außerhalb des Gens auf dem Vektor. „pDS12+“ amplifiziert vom 5'-Ende über die *BamH I*-Schnittstelle hinweg und „pDS12-“ vom 3'-Ende des Inserts über die *Hind III*-Erkennungssequenz.

Nachfolgende Komponenten wurden für die Sequenzierungs-PCR (Tab. 3.2-9) eingesetzt:

Matrizen-DNA	500 ng
Primer, pDS12+ oder pDS12- (10 µM)	1 µl
Pre Mix ¹² (Perkin-Elmer)	4 µl
H ₂ O _{dest.}	ad 20 µl

Das Sequenzierprodukt wurde anschließend mit Ethanol gefällt (Kap. 3.2.1.4), getrocknet und für die Gelaufftrennung zur Fa. GENterprise (Mainz) gegeben. Die nach erfolgter Gelaufftrennung erhaltene Basenfolge wurde mit Hilfe einer geeigneten Software (OMIGA, Oxford Molecular, Oxford, UK) mit der Wildtypsequenz verglichen und auf ihre Korrektheit überprüft.

Tab. 3.2-9: Protokoll der Sequenzierungs-PCR.

Schritt	Zyklenzahl	Temperatur [°C]	Dauer [min]
Denaturierung	25	96	0.15
Annealing		50	2
Amplifizierung		50	2

3.2.2 Mutagenese von Lhca1 und Lhca4

Die Untersuchungen zu Monomerisierungs- und Dimerisierungsverhalten von LHCI-730 und seinen Untereinheiten Lhca1 und Lhca4 wurden mit rekombinanten Proteinen durchgeführt. Diese Methode bietet die Möglichkeit auf der Ebene der DNA vielfältige und einfacher zu erreichende Veränderungen vorzunehmen, als am Protein selber.

Ausgangsmaterial zur Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Deletions- und Punktmutanten waren die Tomaten-cDNAs von *lhca1* und *lhca4* im Expressionsplasmid pDS12 RBSII (Kap. 2.5 und 2.6). Alle Typen von Mutanten wurden mit Hilfe der PCR generiert. Die Mutagenesen wurden mit der *Pfu*-Polymerase (Stratagene, Heidelberg) aus *Pyrococcus furiosus* durchgeführt, die zu ihrer Polymerase-Aktivität zusätzlich eine

¹² Zusammensetzung des Pre Mix (Perkin-Elmer Biosystems, Foster City, USA): ddNTP: ddATP mit Dichloro-(R6G), ddCTP mit Dichloro-(R0X), ddGTP mit Dichloro-(R110), ddUTP mit Dichloro-(TAMRA); dNTP: dATP, dCTP, dGTP, dUTP; Taq-Polymerase, MgCl₂, Tris-HCl (pH 9.0).

3' → 5'-Exonukleaseaktivität besitzt. Diese entfernt und ersetzt falsch eingebaute Nukleotide, was zu einem sehr geringen Einbaufehler führt (Lundberg et al., 1991; Cline et al., 1996).

3.2.2.1 Herstellung von Deletionsmutanten

Die Generierung von Deletionsmutanten mittels PCR eröffnet die Möglichkeit das durch Überexpression synthetisierte Proteinprodukt genau um die gewünschte Aminosäureanzahl zu reduzieren.

N-terminale Deletionsmutanten. Zur Herstellung N-terminal verkürzter Proteine wurde für das 5'-Ende des Gens ein Primer konstruiert, der den N-terminalen Start des Genproduktes bildete. Die Position des Primers ergab sich aus der gewünschten Länge der Deletionsmutante. Der Primer mußte über eine ausreichende Länge homolog zur Matrize sein, da zusätzlich das für die Ligation in den Vektor nötige *BamH I*-Kodon eingefügt werden mußte. Für die Amplifizierung aus der 3'-Richtung wurde ein Primer, homolog zum C-terminalen Ende des Gens synthetisiert.

C-terminale Deletionsmutanten. Sollte ein C-terminal verkürztes Apoprotein generiert werden, mußte der 3'-Primer homolog zu einer Gensequenz in Richtung 5'-Ende sein. Der Primer baute neben dem nötigen *Hind III*-Kodon auch ein Stop-Kodon am Ende der C-terminalen Deletionsmutante ein, damit die Translation an dieser Stelle abgebrochen wird. Zusammen mit dem 5'-Primer am unverkürzten Anfang des Gens, wird die Deletionsmutante amplifiziert.

Die Ligation der Klone über die *BamH I*-Schnittstelle in das Plasmid hat die Einfügung der vier zusätzlichen Aminosäuren M, R, G, S am N-Terminus zur Folge.

Ein typischer PCR-Ansatz zur Herstellung einer verkürzten DNA hatte folgende Zusammensetzung. Dabei war zu beachten, daß die *Pfu*-Polymerase aufgrund ihrer Exonukleaseaktivität (in allen PCR-Ansätzen) zuletzt und kurz vor dem Start der PCR zugegeben werden mußte:

DNA-Matrize (<i>lhca1 / lhca4</i>)	25 ng
10-fach <i>Pfu</i> -Polymerase Puffer	1-fach konzentriert
dNTPs	25 mM (pro Nukleotid)
Primer, vorwärts	250 ng
Primer, rückwärts	250 ng
<i>Pfu</i> -Polymerase	2.5 U
Wasser, destilliert	ad 50 µl

Die Annealing-Temperatur einer PCR ist abhängig von der Länge und dem GC¹³-Gehalt der verwendeten Primer. Es wurde versucht, Primer mit einer Annealing-Temperatur zwischen 50 °C und 57 °C zu entwerfen. Zur Berechnung wurde das Programm *PCheck 1.01* (von Jörg Napiwotzki und Andreas Becker, Universität Marburg) verwendet. Die Temperaturbestimmung (T) erfolgte nach folgender Formel:

$$T = 2 \cdot (A + T) + 4 \cdot (C + G) - 5$$

¹³ Die Wechselwirkungen der einzelnen DNA-Stränge basieren auf Wasserstoffbrückenbindungen der Basen untereinander. Diese unterscheiden sich, so daß die Häufigkeit bestimmter Basen über die Stärke der Stranginteraktion entscheidet.

Die Matrize wurde zuvor mit *EcoR I* restringiert (Kap. 3.2.1.6), um mit einer linearen Matrize eine effizientere Amplifizierung zu erlangen. Ein typisches PCR-Protokoll für die Herstellung von Deletionsmutanten ist in Tabelle 3.2-10 dargestellt.

Tab. 3.2-10: Cycler-Protokoll zur Herstellung von Deletionsmutanten.

Schritt	Zyklenzahl	Temperatur [°C]	Dauer [min]
Denaturierung	1	92	5
Denaturierung	33	92	1
Annealing		50-57	2
Amplifizierung		72	2
Amplifizierung	1	72	3

Das PCR-Produkt wurde im Anschluß über eine Isopropanol-Fällung (Kap. 3.2.1.4) oder durch eine Gelelektrophorese (Kap. 3.2.1.1) mit nachfolgender Gelextraktion (Kap. 3.2.1.3) aufgereinigt.

3.2.2.2 Herstellung von Punktmutanten

Die ortsgerichtete Mutagenese, d.h. ein Basenaustausch, der einen Aminosäurewechsel zur Folge hat, wurde wie bei Chen und Przybyla (1994) beschrieben durchgeführt. Durch Verwendung eines Mutageneseprimers (P_M), der eine modifizierte Nukleotidsequenz enthält, wurde ein von der Originalsequenz in ein oder mehreren Basenpaaren abweichendes Amplifikat generiert. In einer ersten PCR wurde der Mutageneseprimer mit einem Primer P_1 zur Amplifizierung eines möglichst kurzen Fragmentes eingesetzt. P_1 ist der 5'- oder 3'-Primer des Gens. Es wurde, je nach Fall, das Oligomer verwendet, das mit P_M das kürzere Produkt lieferte. In der zweiten PCR wurde das Amplifikat ungereinigt als Primer mit dem Oligomer P_2 zur Vermehrung des gesamten offenen Leserahmens eingesetzt. Mit P_2 ist das Oligomer bezeichnet, das für die Amplifizierung vom entgegengesetzten Ende des P_M+P_2 -Produktes sorgt (Abb. 3.2-1). Der Mutageneseprimer baut zusätzlich eine „stille“ Mutation ein, die zu einer Bildung oder Löschung einer unigenen Restriktionsschnittstelle führt, aber keine Aminosäureveränderungen nach sich zieht. Dadurch wird am Ende der Klonierung das Screening nach potentiellen Klonen ermöglicht (Kap. 3.2.1.9). Folgende Komponenten wurden für einen 50 μ l Ansatz von PCR1 verwendet:

DNA-Matrize (<i>lhca1</i> oder <i>lhca4</i>)	25 ng
10-fach Pfu-Polymerase Puffer	1-fach konzentriert
dNTPs	0.8 mM
Primer P_1	250 ng
Mutageneseprimer	250 ng
Pfu-Polymerase	2.5 U
Wasser, destilliert	ad 50 μ l

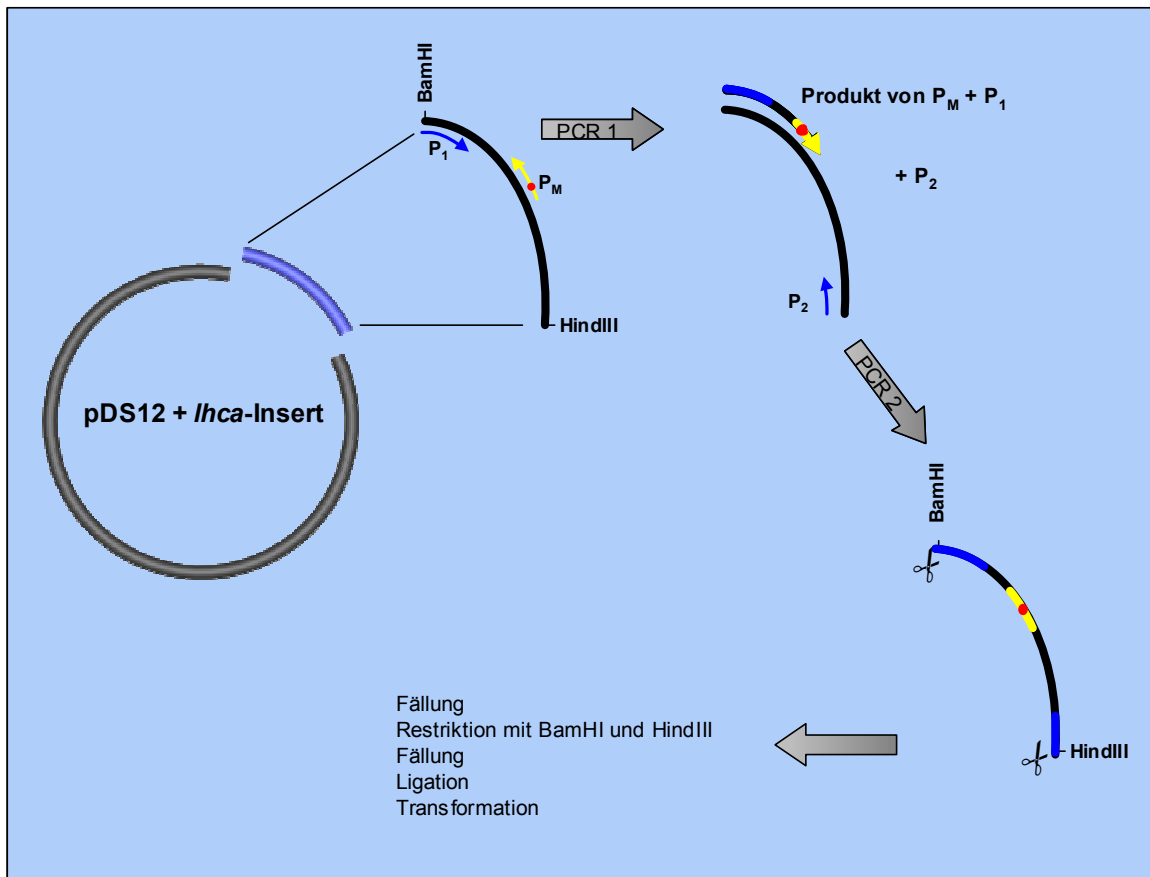


Abb. 3.2-1: Schematische Darstellung einer ortsgerichteten Mutagenese (verändert nach Chen und Przybyla, 1994). Mittels eines flankierenden Primers P_1 , der zum näher gelegenen Ende der zu mutierenden Position liegt, und des Mutagenese Primers P_M wird ein Abschnitt des Insert im Vektor amplifiziert. Das Produkt dieser ersten PCR wird anschließend als Primer mit dem zweiten flankierenden Primer P_2 zur Amplifizierung des kompletten Inserts in eine zweite PCR eingesetzt. Als Matrize wurde auch in diesem Schritt die Ausgangs-DNA eingesetzt.

Da das Produkt von PCR1 als Primer von PCR2 eingesetzt wurde, sind nicht mehr als 25 Zyklen für die Bildung einer ausreichenden Menge Amplifikat nötig. Die Annealing-Temperatur war niedrig gewählt, um eine gute Bindung von Primer und Matrize trotz nicht-komplementärer Primerbasen zu gewährleisten (Tab. 3.2-11).

Tab. 3.2-11: Cycler-Protokoll zur Einfügung gerichteter Mutationen, PCR1.

Schritt	Zyklenzahl	Temperatur [°C]	Dauer [min]
Denaturierung	1	92	5
Denaturierung	25	92	1
Annealing		45	1
Amplifizierung		72	1
Amplifizierung	1	72	3

In der anschließenden zweiten PCR wurde die Ansatzgröße verdoppelt, um ausreichende Mengen Produkt für die weiteren Klonierungsschritte zur Verfügung zu haben:

DNA-Matrize (<i>lhca1</i> oder <i>lhca4</i>)	50 ng
10-fach Pfu-Polymerase Puffer	1-fach konzentriert
dNTPs	0.8 mM
Primer P ₂	500 ng
Primer Produkt PCR 1	1/10 Volumen PCR1
Pfu-Polymerase	5 U
Wasser, destilliert	ad 100 µl

Für die zweite PCR wurden Annealing-Temperatur und Zyklenzahl erhöht. Dadurch wurde zum einen eine höhere Spezifität der Primerbindung sichergestellt, zum anderen die Bildung von ausreichendem Produkt (Tab. 3.2-12).

Tab. 3.2-12: Cycler-Protokoll zur Einfügung gerichteter Mutationen, PCR2.

Schritt	Zyklenzahl	Temperatur [°C]	Dauer [min]
Denaturierung	1	92	5
Denaturierung	33	92	1
Annealing		50	1½
Amplifizierung		72	1½
Amplifizierung	1	72	3

3.2.2.3 Terminologie der Mutanten

Den Deletionsmutanten wurde der Name des Apoproteins, Lhca1 oder Lhca4, vorangestellt, gefolgt von dem großen griechischen Buchstaben Delta (Δ) für Deletion, der Anzahl der entfernten Aminosäuren und N oder C für N- oder C-terminale Deletionsmutanten.

Punktmutanten wurden wie folgt benannt, dem Namen des Apoproteins folgt die Bezeichnung der ersetzten Aminosäure (ein-Buchstaben-Code), deren Position im Protein durch die folgende Zahl bezeichnet wird. Der letzte Buchstabe bezeichnet die neu eingebaute Aminosäure.

3.3 Herstellung der Rekonstitutions-Komponenten

3.3.1 Überexpression und Isolierung von Einschlusskörpern aus Bakterien

Die Kulturgröße für die Überexpression der Lhca1- und Lhca4-Klone war in der Regel 100 ml in einem 250 ml fassenden Erlenmeyer-Kolben. Das LB-Medium (+ Ampicillin) wurde mit 1 ml aus einer Über-Nacht-Kultur beimpft. Die Bakterien wurden bei 37 °C und 175 Upm auf einem Schüttler inkubiert. Erreichte OD₅₅₀ der Kultur einen Wert zwischen 0.45 und 0.65 (entspricht dem Beginn der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien) wurde die Überexpression der eingebrachten DNA mit 1 ml 1 M IPTG (1 mM) induziert. Die Kultur wurde für weitere 4-5 h inkubiert, um den Zellen ausreichend Zeit für Wachstum und

Produktion von Lhca-Apoprotein zu geben. Anschließend konnten die Zellen durch Zentrifugation (5000 g, 8 min, 4 °C) pelletiert werden.

Das Bakterienpellet wurde zunächst in einem kleinen Volumen (0.24 ml) Lysis-Puffer (50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 25% (w/v) Saccharose, 1 mM EDTA-NaOH (pH 7.8)) suspendiert und im Anschluß mit Lysis-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 0.8 ml aufgefüllt. Die Lyse der Bakterienzellwände erfolgte durch 0.2% Lysozym. Die Suspension wurde gut gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schwenken des Reaktionsgefäßes inkubiert. Zur Entfernung von störender DNA wurde DNase1-Lösung (43.5 µg DNase1/ml, in DNase-Puffer: 20 mM Tris/HCl (pH 8.0), 50 mM NaCl, 1 mM DTT und 50% Glycerin) zugegeben. Für die optimale Aktivität der DNase1 wurde 43.5 mM MgCl₂ und 4.35 mM MnCl₂ (Endkonzentrationen) zugegeben. Die Inkubation erfolgte nach guter Durchmischung für 30 min bei Raumtemperatur. Die Lhca-Apoproteine werden im Bakterium als inerte Proteinklumpen angereichert, sogenannte Einschlußkörper oder *inclusion bodies*. Diese sind stabil gegenüber schwachen Detergentien, was man sich für ihre Aufreinigung zu Nutze macht. Zum Lösen störender Substanzen und bakterieneigener Proteine wurde die Proteinlösung mit schwachen Detergentien behandelt. Dazu wurden der Lösung 2 ml Detergenzlösung A (200 mM NaCl, 1% (w/v) Na-Deoxycholat, 1% (v/v) Nonidet 40, 20 mM Tris/HCl (pH 7.5) und 2 mM EDTA/NaOH (pH 7.8)) zugesetzt, der unmittelbar zuvor 30 mM DTT (Endkonzentration) zupipettiert wurden. Die Lösung wurde gut gemischt und nach 2minütiger Inkubation 2 ml Detergenzlösung B (0,5% Triton X-100, 1 mM EDTA/NaOH (pH 7.8)) mit 20 mM DTT zugegeben. Die folgende Zentrifugation erfolgte bei 4 °C für 10 min bei 10 000 g. Der Überstand wurde verworfen und das weißliche Proteinpellet mit 0.8 ml Detergenzlösung B plus 20 mM DTT suspendiert. Die Suspension wurde gut gemischt und nach 1minütiger Inkubation bei 4 °C für 10 min bei 10 000 g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml Suspensionlösung (50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA/NaOH (pH 7.8), 20 mM DTT) aufgenommen.

3.3.2 Protein-Quantifizierung

Die Quantifizierung der Proteine aus der Einschlußkörper-Isolierung wurde mit dem Protein-Assay der Firma Bio-Rad (München) durchgeführt. Das Protein-Assay basiert auf der Verschiebung der maximalen Absorptionswellenlänge von Coomassie Brilliant Blue G-250 Lösung bei Bindung von Protein von 460 nm auf 595 nm (Bradford, 1976). Zur Bestimmung der Einschlußkörperkonzentrationen wurde nach vorgeschriebenem Protokoll des Herstellers eine Eichreihe mit BSA erstellt. 5 µl der Einschlußkörper-Lösung (nach kurzer Behandlung im Ultraschallbad und Entnahme direkt nach dem Vortexen mittels einer abgeschnittenen Pipettenspitze) wurden mit 5 µl 1% LDS gemischt bis die Proteine in Lösung waren. Dazu wurden dann 30 µl H₂O pipettiert und gemischt. 10 µl davon wurden mit der gleichen Menge H₂O verdünnt. Um eine Störung der Messung durch LDS in der Einschlußkörperprobe berücksichtigen zu können, wurde eine Kontrolle ohne Protein, mit LDS durchgeführt. Dazu wurden 5 µl 1% LDS mit 35 µl H₂O gemischt. 10 µl von der LDS-Lösung wurden mit 10 µl H₂O verdünnt. Protein- und LDS-Lösung wurden mit 980 µl 1:5 verdünntem Bio-Rad-Reagenz gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption der Proben wurde anschließend im Photometer bei 595 nm gemessen, aus der sich mittels Regressionsanalyse aus der Eichreihe die Konzentration errechnen ließ. Die Werte der LDS-Probe wurden von den Messwerten der Proteinlösungen subtrahiert. Der Nullabgleich des Photometers wurde mit einer Lösung aus 20 µl H₂O und 980 µl Reagenz-Lösung durchgeführt.

3.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen eignet sich die Gelelektrophorese. Dabei werden die Proteine in einer Matrix, die durch Vernetzung von Acrylamid und N,N'-Methylen-bisacrylamid entsteht, aufgetrennt. Acrylamid bildet lange Ketten, die durch Bisacrylamid quervernetzt werden. Die Vernetzungsdichte ergibt sich dabei sowohl aus dem Verhältnis von Acrylamid und Bisacrylamid als auch der Menge dieser Substanzen im Gel. Die Vernetzung von Acrylamid und Bisacrylamid benötigt Ammoniumperoxodisulfat (APS, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$). Durch die Bildung von Sulfatradikalen in wässriger Lösung wird die radikalische Polymerisation gestartet. Tetramethylethyldiamin (TEMED) stabilisiert die freien Radikale. Natrium- (SDS) bzw. Lithiumdodecylsulfat (LDS) löst Proteine und ermöglicht durch eine negative Ladung eine gleichmäßige Wanderung im elektrischen Feld, die sich linear zum reziproken Logarithmus ihrer Größe verhält. Bei der denaturierenden Elektrophorese ist die Differenz in der Acrylamidkonzentration beim Übergang von Sammel- in Trenngel für eine Konzentrierung der Proteine an der Grenzfläche verantwortlich, so daß scharfe Banden bei der Auftrennung im Trenngel entstehen. In schwach-denaturierenden Gelen werden im Sammelgel die Proteine zunächst durch den niedrigen pH-Wert von 6.8 an der Grenzfläche zum Trenngel fokussiert, die Separierung der Moleküle findet anschließend im Trenngel nach ihrer Größe statt.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Polyacrylamid-Gelelektrophoresesysteme verwendet. Die Auftrennung von Einschlusskörper-Proteinen und die Überprüfung deren Molekülmassen wurde in einer SDS-Gelelektrophorese in Anlehnung an Laemmli (1970) durchgeführt. Als Größenvergleich diente der SDS-7 Standard (Kap. 2.4.2). Die Untersuchungen zur Rekonstitutionsfähigkeit und Dimerisierung der Komplexe erfolgte in einem schwach denaturierenden Gelsystem (Kap. 3.4.2.1).

3.3.3.1 Voll denaturierende Gelelektrophorese

Für die voll denaturierende elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde das System nach Laemmli (1970) verwendet (Tab. 3.3-1).

Tab. 3.3-1: Zusammensetzung voll denaturierender Polyacrylamid-Gele.

Komponenten	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid/Bisacrylamid (30:1)	15% (w/v)	4.5% (w/v)
Tris/HCl (pH 8.8)	400 mM	
Tris/HCl (pH 6.8)		130 mM
TEMED	0.05% (v/v)	0.05% (v/v)
APS	0.07% (w/v)	0.05% (w/v)

Die Herstellung der Gele erfolgte in zwei Schritten im Midget-Gel System. Zuerst wurde das Trenngel gegossen. Puffer, Wasser und Acrylamid wurden zusammenpipettiert und unmittelbar vor dem Gießen TEMED und APS unter mischen zugegeben. Damit die Grenzfläche zum Sammelgel nicht austrocknet wurde diese mit wassergesättigtem Butanol vorsichtig überschichtet und mit Folie bedeckt. Nachdem die Lösung polymerisiert war, wurde nach Entfernung des Butanols mit der Lösung für das Sammelgel überschichtet und die Kämme zur Bildung der Taschen eingesetzt.

Die Proteinproben wurden wie folgt vorbereitet: 2 µg entsprechende Proteinlösung wurde mit H₂O_{dest.} auf 10 µl aufgefüllt und mit Denaturierungspuffer (5% (w/v) LDS, 180 mM DTT, 70 mM Tris/HCl (pH 8,4), 0,666 M Saccharose, Bromphenolblau) im Verhältniss 2:1 gemischt, für 1 min gekocht und im Anschluß 10 µl der Lösung auf das Gel aufgetragen. Daraus ergibt sich ein Proteinmenge von 1 µg pro Tasche. Der Gellauf erfolgte bei konstant 8 mA und 10 °C bis das Bromphenolblau das Ende des Trenngels erreicht hatte. Als Laufpuffer wurde verwendet:

50 mM Tris
384 mM Glycin
1 mM Na-EDTA (pH 7.5 oder 7.8)
0.1 % SDS (nur für Kathodenpuffer nötig)

Denaturierte Proteine sind nach der Gelelektrophorese nicht sichtbar. Eine einfache Methode zur Anfärbung ist die Verwendung von Coomassie, einem Farbstoff der spezifisch die Arginin-Reste von Aminosäuren anfärbt. Das Gel wurde nach Beendigung der Auftrennung in der Färbelösung (0.3% Coomassie-Brilliant-Blue, 50% Ethanol, 7% Eisessig) für 25 min auf dem Schüttler inkubiert. Danach folgte ein erster Entfärbeschritt im 1. Entfärber (20% Ethanol, 7% Eisessig) für ebenfalls 25 min und eine Inkubation im 2. Entfärber (10% Eisessig) bis der Hintergrund des Gels wieder farblos war. Die Gele wurden elektronisch eingelesen (Epson Scanner, Modell GT 7000) und/oder zwischen zwei Lagen Cellophan getrocknet.

3.3.3.2 Schwach denaturierende Gelelektrophorese

Um optimale Ergebnisse mit der schwach denaturierenden Gelelektrophorese zu erreichen wurden verschiedene Laufpuffer und Gelzusammensetzungen miteinander verglichen. Wechselseitig wurden Puffer- und Gelsystem nach Knoetzel und Simpson (1991) mit einem System von Santini et al. (1994) und mit dem unten beschriebenen Gelsystem getestet. Dabei erwies sich das unten vorgestellte Puffer-Gelsystem als am geeignetsten für die Auftrennung rekonstituierter LHC.

Die schwach denaturierende Gelelektrophorese wurde wie bei Schmid und Schäfer (1994) beschrieben durchgeführt. Die Herstellung der Gele erfolgt wie unter 3.3.3.1 beschrieben. Die Zusammensetzung der Gele war wie in Tabelle 3.3-2 aufgeführt.

Tab. 3.3-2: Zusammensetzung schwach denaturierender Polyacrylamid-Gele.

Komponenten	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid/Bisacrylamid (30:1)	12% (w/v)	4.5% (w/v)
Tris/HCl (pH 9.1)	0.424 M	
Tris/H ₂ SO ₄ (pH 6.1)		54 mM
Saccharose	0.292 M	0.292 M
TEMED	0.075% (v/v)	0.075% (v/v)
APS	0.03% (w/v)	0.06% (w/v)

Zur schonenderen Auftrennung von Pigment-Protein-Komplexen wurden Polyacrylamidgele mit Saccharose verwendet. Zur Realisierung einer schwach denaturierenden Proteinauftrennung wurde LDS im Laufpuffer verwendet, was im Gegensatz

zu Natriumdodecylsulfat (SDS) bei niedrigen Temperaturen nicht ausfällt und somit die Möglichkeit bietet die elektrophoretische Auftrennung bei einer Temperatur von 4 °C durchzuführen. Die Stromstärke ist deutlich geringer als bei denaturierenden Gelen und beträgt konstant 4 mA. Die Elektrophoreseapparatur wird während des Laufes abgedunkelt. Die Proben wurden unmittelbar nach der Rekonstitution in die Geltaschen pipettiert. Durch die Pigmentierung der rekombinanten Lichtsammelkomplexe war ein nachträgliches Anfärben der Proteine nicht nötig. Die Gelaufftrennung wurde beendet, wenn sich Proteinkomplex- und freie Pigmentbanden ausreichend voneinander getrennt hatten. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden die Gele mittels eines Scanners eingelesen.

Als Laufpuffer diente:

25 mM Tris
192 mM Glycin
0.1 % LDS (nur für Kathodenpuffer nötig)

3.3.4 Isolierung von Gesamtpigmentextrakt aus Tomatenblättern

Die Gewinnung des Gesamtpigmentextraktes erfolgte aus zuvor isolierten und bei -80 °C gelagerten Thylakoiden. Für die Thylakoidisolierung wurden Tomatenblätter mittels eines Ultraturax in eiskalter Homogenisierungslösung (0.4 M Sorbitol, 0.1 M Tricine/NaOH (pH 7.8)) homogenisiert. Die Lösung wurde im Anschluß durch vier Lagen Miracloth (Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach) filtriert und abzentrifugiert (5 min, 4 °C, 3000 g). Der Überstand wurde dekantiert und verworfen. Der resultierende, die Thylakoidmembranen enthaltende Niederschlag wurde in eiskalter Breaklösung (50 mM Sorbitol, 10 mM Tricine/NaOH (pH 7.8), 5 mM EDTA/NaOH (pH 7.8)) suspendiert. Um vorhandene Stärke zu entfernen, wurde diese durch Zentrifugation für 3 min bei 500 g pelletiert. Der Überstand wurde für 10 min bei 12300 g zentrifugiert. Das erhaltene Niederschlag wurde in Suspensionslösung (30% Saccharose, 10 mM Tricine/NaOH (pH 7.8), 1 mM EDTA/NaOH (pH 7.8)) suspendiert und in dieser Form bei -80 °C aufbewahrt.

Die zur Isolierung von Gesamtpigmentextrakt verwendeten Thylakoide wurden nach dem Auftauen unter kaltem Wasser mit etwa dem fünffachen Volumen an kalter 20 mM Tricine/NaOH (pH 7.8) Lösung und dem vierfachen Volumen an reinem, kaltem Aceton versetzt, woraus eine Aceton Endkonzentration von 80% resultierte. Die Lösung wurde gut gemischt und in einem geschlossenen Gefäß für 30 min bei -20 °C aufbewahrt. Dabei ausgefallenes Protein wurde abzentrifugiert (10 min, 12300 g, 4 °C). Nach Überführung des Überstandes in einen geeigneten Scheidetrichter wurde die Lösung mit Wasser auf das doppelte Volumen aufgefüllt und ein halbes Volumen Ether zugegeben. Es wurde vorsichtig gemischt und gewartet bis sich die Phasen entsprechend ihrer Polarität getrennt hatten. Durch Zugabe von festem NaCl konnte die untere, wässrige Phase noch polarer gemacht werden. Das unterstützte die Migration der Pigmente in die obere Etherphase. Die untere Phase wurde nach Ablassen aus dem Scheidetrichter, falls eine weiterhin starke Färbung vorhanden war, nochmals mit Ether versetzt. Die obere Schicht wurde nochmal für einige Minuten stehen gelassen und gewartet bis sich weiteres vorhandenes Wasser vom Ether trennte.

Die Etherphase wurde in einen Kolben überführt, um noch vorhandenes Wasser auszufrieren (mindestens 1 h bei -20 °C oder -80 °C). Das gefrorene Wasser wurde dann durch ebenfalls gekühlte Filter mit Hilfe eines Vakuums in einer Glassaugflasche vom Ether getrennt. Der Gesamtpigmentextrakt wurde anschließend im Rotationsverdampfer vom Ether befreit und eingetrocknet. Nach Lösung in einem kleinen Volumen reinen Aceton wurde die

Chlorophyllkonzentration photometrisch bestimmt (Kap. 3.3.5) und die Proben aliquotiert. Das Pigmentextrakt wurde im Stickstoffstrom getrocknet, mit N₂ überschichtet und auf dem Kopf liegend bei -20 °C gelagert.

3.3.5 Chl *a/b*-Quantifizierung

Bestimmung der Chl a/b-Konzentrationen im Gesamtpigmentextrakt

Das Gesamtpigmentextrakt für die Rekonstitutionen wurde auf die vorhandene Chl *a* und Chl *b* Menge bezogen eingesetzt. Die Quantifizierung beider Spezies erfolgte photometrisch am U-2000 Spektrophotometer. Die Konzentration von Chl *a* und *b* wurde nach dem Algorithmus von Porra et al. (1989) in 80% Aceton ermittelt. Um unspezifische Streuungen dedektieren zu können, wurde bei 750 nm ein Korrekturwert aufgenommen und mit den Chl-Werten verrechnet:

$$\begin{aligned}\text{Chl } a &= 12.3 \cdot A_{663} - 2.6 \cdot A_{645} \text{ } [\mu\text{g/ml}] \\ \text{Chl } b &= 20.3 \cdot A_{645} - 4.9 \cdot A_{663} \text{ } [\mu\text{g/ml}]\end{aligned}$$

Bestimmung der Chl a/b-Konzentrationen und -Verhältnisse im LHC

Der durch Saccharosedichtegradienten-Ultrazentrifugation (Kap. 3.4.2.2) gewonnene LHC wurde nach Konzentrierung (Kap. 3.4.3) für die folgende Messung so eingesetzt, daß durch Zugabe von 100% Aceton eine 80%ige Lösung entstand. Vor der Messung wurde die Probe kurz zentrifugiert, um ausgefallenes Protein und andere Schwebeteilchen, die die Datenaufnahme stören könnten, aus der Lösung zu entfernen. Das weitere Verfahren war wie oben beschrieben.

3.4 Rekonstitution und Charakterisierung der LHCs

3.4.1 Rekonstitution

Die Rekonstitution von Lhca-Apoprotein mit Gesamtpigmentextrakt wird durch Zugabe von nicht-ionischem Detergenz erreicht. Das Protein wird in Lithiumdodecylsulfat (LDS), einem ionischen Detergenz, gelöst. Nach Zugabe von Octylglucosid (OG) und Kochen der Lösung werden Protein-Detergenz Micellen gebildet. Im abschließenden Schritt wird mit Kaliumchlorid das LDS als bei niedrigen Temperaturen schwer lösliches Kaliumdodecylsulfat ausgefällt und durch Zentrifugation pelletiert. Dabei werden die Proteine und Pigmente aus LDS-Mizellen über LDS-OG-Mischmizellen in reine OG-Mizellen gezwungen. Durch diese physikalische Umgebungsveränderung wird die Faltung des Proteins unter gleichzeitiger Pigmentbindung induziert (Hobe und Paulsen, 1998).

Das im folgenden beschriebene Protokoll zur Rekonstitution bzw. Dimerisierung von Lhca1 und/oder Lhca4 oder deren Mutanten wurde zu Beginn dieser Arbeit auf die hergestellten Apoproteine sowie den isolierten Gesamtpigmentextrakt optimiert. Sie beruht auf den Vorgaben von Schmid et al. (1997). Der Nachweis der Pigment-Protein-Komplexe mittels schwach denaturierender Gelelektrophorese oder Saccharosegradienten, machte zwei leicht variierende Protokolle nötig.

Rekonstitution für anschließende gelelektrophoretische Auftrennung:

1. Eine 25 µg entsprechende Menge Proteinlösung¹⁴ wurde nach gründlichem Vortexen und 1minütiger Suspendierung im Ultraschallbad aus der Vorratslösung entnommen¹⁵, mit H₂O_{dest.} auf 16 µl Endvolumen gebracht und mit 16 µl 2 x Rekonstitutionspuffer + Saccharose (200 mM Tris, 10 mM ε-Amino-n-capronsäure, 2 mM Benzamidin, 25% (w/v) Saccharose, 4% (w/v) LDS, 100 mM DTT) gemischt, wodurch das Protein gelöst wurde.
2. Nach Zugabe von 3.7 µl 20%igem OG wurde die Lösung nach Vortexen für 1 min gekocht und sofort auf Eis gestellt.
3. 1.2 µl 1 M DTT wurden zupipettiert und die Lösung auf Eis gestellt bis 30 µg Chl a+b entsprechenden Gesamtpigmentextrakt in 1.2 µl Ethanol gelöst worden sind.
4. Dem gelösten Pigmentextrakt wurde unter Vortexen die Proteinlösung zugegeben und für weitere 15 sek damit fortgefahren.
5. Die Pigment-Protein-Lösung wurde anschließend für eine Minute gekocht und für kurze Zeit auf Eis abgekühlt.
6. Nach Zugabe von 5.7 µl 1 M KCl und kurzem Mischen wurde die Lösung für 20 min bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert
7. und danach für 5 min bei 16000 g zentrifugiert.
8. Der Überstand wurde in ein neues, vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und entsprechend der Größe der Geltaschen jeweils 17.5 µl (bei Kämmen mit 15 Probestaschen) bzw. 22.5 µl (bei Kämmen mit 10 Probestaschen) aufgetragen.

Für Rekonstitutionen zur nachfolgenden Saccharosedichtegradienten-Ultrazentrifugation weicht das Protokoll wie folgt ab:

1. Proteinmenge: 166.76 µg; die Proteinlösung wird auf 80 µl aufgefüllt; der verwendete 2 x Rekonstitutionspuffer (80 µl) enthält keine Saccharose (wird nur zum Beschweren der Probe für das Gel benötigt)
2. 18.5 µl 10% OG
3. 6 µl Ethanol, 6 µl DTT
6. 28.8 µl KCl
8. Auftrag der gesamten Probe auf den Gradienten

3.4.2 Nachweis und Isolierung von LHCs

Zum Bildungsnachweis gefalteter monomerer oder dimerer Pigment-Protein-Komplexe wurden zwei Methoden verwendet. Die Auftrennung von Rekonstitutionsprodukt in schwach denaturierenden LDS-Polyacrylamidgelen ist ein schonendes elektrophoretisches Trennverfahren, das es erlaubt, in relativ kurzer Zeit größere Mengen an Proben auf die Bildung monomerer bzw. dimerer Pigment-Protein-Komplexe zu untersuchen. Daher wurde sie in dieser Arbeit als entscheidendes Kriterium dafür angesehen, ob Lhca-Proteine noch stabilen LHC bilden. Das weniger stringente Verfahren der Separierung im

¹⁴ Für Rekonstitutionen zur Dimerisierung wurden pro Apoprotein jeweils 12.5 µg Protein eingesetzt.

¹⁵ Dazu wurden die Pipettenspitzen, um die Öffnung zu vergrößern und die Spitze nicht zu verstopfen, etwas abgeschnitten.

Saccharosegradienten diente der Gewinnung größerer Probenmengen für die weitere Charakterisierung der LHCs.

3.4.2.1 LHC-Auftrennung mittels schwach denaturierender Gelelektrophorese

Die Herstellung und das elektrophoretische Verfahren sind in Kap. 3.3.3.2 bereits beschrieben worden. In einigen Fällen der Auftrennung von Rekonstitutionsprodukten war das Ergebnis nicht immer eindeutig. Die Intensität von Banden schwankte oder es konnte – bei instabilen Mutanten – keine Bande mehr detektiert werden. War das der Fall, wurden die Bandenintensitäten densitometrisch ermittelt und eine statistische Verteilung berechnet.

Für die Quantifizierung der Rekonstitutionseffizienz nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Komplexe wurde das Programm *AIDA 1000/1D Image Analyzer software*, Version 1.02 (Raytest Isotopenmeßgeräte, Straubenhardt) verwendet. Dabei wurde die Intensität der Wildtypbande in jedem Gel auf 100% gesetzt und die entsprechende Intensität der Mutanten dazu bestimmt.

3.4.2.2 LHC-Auftrennung mittels Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

Die Charakterisierung von Pigment-Proteinkomplexen erfordert größere Mengen als sie durch eine Gelaufreinigung erreicht werden könnten. Die verwendeten Saccharosegradienten (Volumen 10 ml) erlaubten die Isolierung von 200 µg, um eine saubere Trennung von LHC- und freien Pigmentbanden zu gewährleisten. Optimale Trennbedingungen lieferten Gradienten mit folgender Zusammensetzung: 0.05 bis 0.8 M Saccharose, 5 mM Tricine/NaOH (pH 7.8) und 0.08% β-D-Dodecylmaltosid (w/v). Die Herstellung des Gradienten erfolgte durch einen einmaligen Gefrier-Tau-Zyklus. Nach dem Auftauen wurde der oberste Milliliter des Gradienten abgenommen. Damit wurde sichergestellt, daß die Rekonstitutionsprobe auf der Oberfläche der Gradientenlösung blieb. Die Zentrifugation wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 39000 Upm (Rotoren: TST 41.14 oder SW 41 Ti), Temperatur: 4°C, Dauer: 23 h.

3.4.3 Charakterisierung rekonstituierter LHCs

Das nach der Ultrazentrifugation aus den Saccharosedichtegradienten gewonnene Material wurde zur Bestimmung der Chl-Konzentration und der Chl *a/b*-Verhältnisse mittels Spektrometer mit Centrikon Ultrafiltrationsröhrchen nach Anweisung des Herstellers konzentriert. Dadurch konnten Messungen der Chlorophyllkonzentrationen im optimalen Detektionsbereiches des Photometers sichergestellt werden. Die Proben zur Tieftemperatur-Fluoreszenz-Untersuchung sowie CD-Messung wurden, um die Intaktheit der LHC nicht zu gefährden, nicht angereichert.

3.4.3.1 Pigment-Quantifizierungen

Bestimmung der Chl a/b-Verhältnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Chl *a/b*-Verhältnisse der LHC (Monomere oder Dimere) durch photometrische Bestimmung der Chl *a*- und Chl *b*-Konzentrationen ermittelt.

In Kap. 3.3.5 ist das Verfahren der photometrischen Bestimmung der Chl-Konzentrationen von LHCs erläutert. Durch Messung der Konzentrationen der einzelnen Chl-Spezies ließ sich auf einfachem Weg das Verhältnis von Chl *a* und Chl *b* berechnen.

Bestimmung der Pigment-Zusammensetzung mittels analytischer HPLC

Mittels des analytischen HPLC-Systems der Firma Kontron Instruments (Neufahrn) wurde die Pigmentierung monomerer Lhca1- und Lhca4-Komplexe untersucht. Die verwendete Säule trennte die Chromophoren im Reversed-Phased Verfahren auf. Als Laufmittel diente Aceton, dessen Gradientenprofil in folgender Graphik (Abb. 3.4-1) dargestellt ist. Dieser beginnt bei 70% Aceton und steigt in 13 min linear auf 100% an. Nach vier Minuten bei dieser Konzentration kann man davon ausgehen, daß alle Pigmente von der Säule eluiert worden sind. Nach einem linearen Abfall auf 70% wird die Säule für eine neue Probe wieder in den Ausgangszustand zurückversetzt.

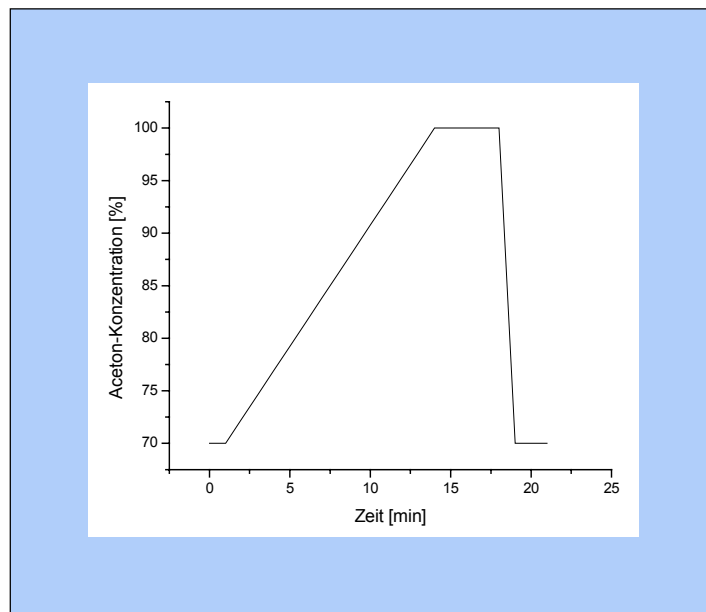


Abb. 3.4-1: HPLC-Elutionsprofil. Die Pigmentauftrennung wurde mit einer Reversed-Phase-Säule, über einen 22minütigen Acetongradienten erzielt.

Die, in der Reihenfolge ihrer Polarität, von der Säule eluierten Pigmente wurden mittels Dioden Array Detector erfasst und bei fünf verschiedenen Wellenlängen die Absorptionssignale aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit der Software *Kroma System 2000*. Die Menge an Chromophor wurde anschließend durch Multiplikation der Absorptionssignalfächen mit einem geeichten Umrechnungsfaktor (Dr. Stephan Hobe, mit bestem Dank) berechnet (Tab. 3.4-1).

Tab. 3.4-1: Absorptionswellenlängen zur Detektion und Umrechnungsfaktoren zur Bestimmung von Pigmentmengen nach Auftrennung mit der analytischen HPLC

Pigment	Detektionswellenlänge [nm]	Umrechnungsfaktor [$\cdot 10^{-7}$ mol]
Neoxanthin	445.5	5.896
Violaxanthin	443.5	4.548
Lutein	448.5	5.405
Chl <i>b</i>	458.5	7.097
Chl <i>a</i>	432.5	12.469

Die Proben wurden nach einer Chlorophyllbestimmung mit 5 mM Tricine/NaOH (pH 7.8) auf 6 μg Chl/ml eingestellt. 50 μl aus dieser Lösung wurden mit 200 μl 100% Aceton versetzt und gevortext, nach Zugabe von 200 μl Ether und 50 μl 5 M NaCl, wobei nach jedem Schritt gemischt wurde, folgte eine einminütige Zentrifugation (10000 g) bei 4 °C. Die obere Etherphase wurde vorsichtig abgezogen und im Stickstoffstrom eingetrocknet. Die so präparierten Proben wurden erst unmittelbar vor dem Aufspritzen auf die HPLC-Säule in 30 μl 80% Aceton gelöst.

3.4.3.2 Protein-Quantifizierung der LHC und Berechnung der Pigment/Protein-Stöchiometrie

Für die Bestimmung der Proteinmengen in den zu untersuchenden LHC-Proben, wurde das BCA-Protein Assay Kit von Pierce (Rockford, USA) verwendet, das gegenüber Detergentien im Reaktionsansatz kaum oder gar nicht empfindlich ist. Es ist daher für diesen Versuch besser geeignet als der standardmäßig für die Einschlußkörper-Bestimmung verwendete Protein-Assay von Bio-Rad (Kap. 3.3.2).

Für die Untersuchungen wurden nur die beiden dimeren C-terminalen Deletionsmutanten Lhca1 Δ 16C und Lhca4 Δ 32C verwendet und mit dem dimeren Wildtyp verglichen, da ihre Fluoreszenzemissions- und CD-Spektren von denen des Wildtyps abwichen.

BCA-Assay (Smith, 1985): Die Probenaufbereitung erfolgte wie im Protokoll (*The Microwell Plate Protocol*) des Herstellers beschrieben (Sorensen und Brodbeck, 1986). Als Standard diente BSA, mit dem durch Lösungen von 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eine Eichgerade erstellt wurde. Als *blanck* diente 25 μl H₂O_{dest.} plus 200 μl Reaktionslösung. Damit die Färbung der Chl in der Probe aus den Messwerten herausgerechnet werden kann, wurden von jeder LHC-Probe 25 μl mit 200 μl BCA-Lösung (ohne Kupfer-Lösung) vermischt. Die dabei ermittelten Daten wurden von den eigentlichen Proben subtrahiert. Alle Proben wurden im Spectra Max plus Mikrotiterplatten-Reader photometrisch bei 562 nm gemessen. Die Messungen wurden pro LHC-Klon fünf- bis sechsmal wiederholt.

Die im BCA-Assay ermittelten Protein-Konzentrationen ($\mu\text{g}/\text{ml}$) wurden auf die Molmassen umgerechnet. Die Molekulargewichte der Apoproteine entstammten der Berechnung durch die Software *OMIGA* (Oxford Molecular, Oxford, UK): Lhca1, M_r 21879; Lhca4, M_r 22336. Die ermittelten Chl-Konzentrationsbestimmungen (3.4.3.1) der LHC wurden ebenfalls auf die Molmassen¹⁶ umgerechnet, so daß durch Normierung auf ein Proteindimer die Verhältnisse von Pigment und Protein bestimmt werden konnten.

¹⁶ Chl *a*: 893.5 g/mol; Chl *b*: 907.5 g/mol

3.4.3.3 Tieftemperatur-Fluoreszenzspektroskopie bei 77 K

Um eine optimale Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten wurden diese auf die gleiche Chlorophyllkonzentration eingestellt. Die Quantifizierung vom Gradientenmaterial erfolgte mittels einer Chlorophyllbestimmung nach Porra et al. (1989; Kap. 3.4.3.1). Das 1.8 µg Chl entsprechende Volumen wurde mit Dichtegradienten-Lösung auf 200 µl aufgefüllt. Dazu wurde 400 µl FluoroMax-Lösung (Endkonzentration: 50% Glycerin, 5 mM Tricine/NaOH (pH 7.8), 0.05% β-D-Dodecylmaltosid) pipettiert. Die eingesetzte Konzentration an Chl entsprach somit 3 µg Chl/ml.

Die Messungen erfolgten unter Einsatz einer Tieftemperatureinheit (ISA Jobin-Yvon-Spex, Grasbrunn) bei Excitation von 440 nm (Chl *a* Anregung) und 470 nm (Chl *b* Anregung). Die Spaltbreite des Anregungslichtes betrug 3 nm. Die Aufnahme der Daten erstreckte sich über einen Bereich von 630 bis 800 nm in 1 nm Schritten bei einer Spaltbreite von 1 nm. Die Aufnahmezeit pro Datenpunkt betrug in der Regel 1 sek und wurde, wenn nötig, verlängert. Die Datenaufnahme wurde im allgemeinen dreimal wiederholt und durch die Analysesoftware *Datamax* ein Mittelwert berechnet.

3.4.3.4 CD-Spektroskopie

Die durch Saccharosedichtegradienten-Ultrazentrifugation gewonnenen Proben wurden mit 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) auf eine Chlorophyllkonzentration von 20 µg/ml verdünnt. Die Datenaufnahme erfolgte bei 4 °C von 190 bis 750 nm in Abständen von 0.5 nm (Spaltenbreite, 4 nm; Response, 4 sec, Aufnahme Geschwindigkeit, 50 nm • min⁻¹).

4 Ergebnisse

Durch viele Untersuchungen an verschiedenen Proteinen, aber auch an Verwandten der Lhca-Proteine, weiß man, daß Strukturen, Motive und einzelne Aminosäuren existieren, die konkrete Funktionen vermitteln (Kühlbrandt et al., 1994; Hobe et al., 1995; Kuttkat et al., 1996). Das können Bereiche sein, die enzymatische Aktivität besitzen, aber auch Regionen, die für die Stabilität des gefalteten Komplexes oder die Interaktion von zwei oder mehreren Untereinheiten essentiell sind.

Der LHCI-730 ist ein heterodimerer Komplex, bestehend aus den beiden Untereinheiten Lhca1 und Lhca4, die *in vivo* und *in vitro* als eigenständige monomere Komplexe gefaltet werden können. In dieser Arbeit werden zum ersten Mal die Ergebnisse von Untersuchungen zur Stabilität der monomeren Bestandteile des LHCI-730 sowie zu deren Assemblierung zum dimeren Komplex im Zusammenhang vorgestellt.

Zur Bestimmung, der für die Stabilität von monomeren und dimeren Pigment-Protein-Komplexen wichtigen Strukturen und Aminosäuren, mußte eine Reihe von modifizierten Apoproteinen hergestellt werden. Die Generierung der Mutanten stellte einen wesentlichen Teil dieser Arbeit dar und wird in Kapitel 4.1 in Form einer Strategie und eines chronologischen Ablaufes der Herstellung dokumentiert. Kapitel 4.2 beschäftigt sich mit den Untersuchungen zur Rekonstitution der monomeren Komplexe und in Kapitel 4.3 sind die Resultaten zur Assemblierung beider Untereinheiten beschrieben.

Modifikationen in der Aminosäuresequenz von Proteinen können sich in Form von Veränderung in der Konformation und von Eigenschaften, wie z.B. reduzierter Stabilität und Assemblierungsfähigkeit von monomeren und dimeren Pigment-Protein-Komplexen äußern. Untersuchungen rekombinanter Proteine in einem *in vitro* System zur Rekonstitution und Oligomerisierung erlauben es, Beziehungen von Struktur und Funktion aufzuklären. Modifikationen in der Sequenz verwendeter Proteine ermöglichen die Lokalisierung von essentiellen strukturellen Bereichen oder Aminosäuren. Es wurde entschieden, die Stabilität rekonstituierter monomere und dimerer Komplexe in einem schwach denaturierenden Gelsystem als Kriterium für einen stabil gefalteten bzw. assemblierten LHC zu wählen. Die Gelelektrophorese stellt eine vergleichsweise stringente Methode zur Auftrennung von Lichtsammelkomplexen dar. Schonendere analytische Verfahren sind die Separierung durch Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation oder Chromatographie. Diese Methoden haben den Nachteil, daß sie die Untersuchung nur weniger Proben in einem Zeitraum zulassen. Dagegen bietet die Gelelektrophorese die Möglichkeit eines umfangreichen Screenings und mehrmaligen Wiederholens von Experimenten zur Verifizierung von Ergebnissen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sichergestellt, daß das hier verwendete elektrophoretische System (Gel, Laufpuffer und Elektrophoresebedingungen) im Vergleich zu anderen elektrophoretischen Verfahren schonender ist und gleichzeitig eine gute Auftrennung gewährleistet (Kap. 3.3.3.2).

4.1 Mutagenese von Lhca1- und Lhca4-Proteinen

Grundlage für die Untersuchungen an Deletions- und Punktmutanten war die Herstellung modifizierter Apoproteine. In diesem Kapitel wird zunächst die Vorgehensweise zur Identifizierung der für die Bildung stabiler monomere und dimerer LHCs nicht benötigten Proteinabschnitte beschrieben (Kap. 4.1.1). In Kapitel 4.1.2 folgt eine chronologische Abfolge der Mutantengenerierung, deren Details Kapitel 3.2 entnommen werden können.

4.1.1 Strategie und Reihenfolge der Mutantengenerierung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die jeweils kürzest möglichen Apoproteine gefunden werden, die die Bildung von monomeren Pigment-Protein-Komplexen und die Assemblierung zu Dimeren ermöglichen. Die zu Beginn der Mutagenese gewählten Deletionen der kompletten extrinsischen Termini orientierten sich an Arbeiten am LHCII von Cammarata und Schmidt (1992), Paulsen und Hobe (1992) und Paulsen und Kuttkat (1993). Als Voraussetzung für eine Dimerisierung der beiden Untereinheiten wurde angenommen, daß stabile monomere LHCs gebildet werden müssen. Für die Herstellung von Punktmutanten war die Bestimmung der kritischen Aminosäure, die Aminosäure deren Deletion zum Verlust der Dimerisierungsfähigkeit führt, entscheidend. Der Austausch von Aminosäuren an dieser Position diente dazu, deren Bedeutung unabhängig von der Entfernung eines N- oder C-terminalen Peptidrestes zu bestimmen. Daraus ergab sich folgende Vorgehensweise bei der Herstellung der Deletionsmutanten.

Monomere. Zur Ermittlung der kürzest möglichen Mutante, die stabile Monomere bildet, wurden der N- oder C-Terminus von Lhca1 und Lhca4 bis zum Anfang der ersten bzw. Ende der dritten Transmembranhelix verkürzt. War das Proteinprodukt stabil, wurden fünf weitere Aminosäuren entfernt. Nach Ausbleiben eines stabilen Rekonstitutionsproduktes wurde dieser Bereich bis zur Bestimmung der letzten monomerbildenden Mutante eingegrenzt. War die erste Deletionsmutante bereits nicht mehr zur Bildung eines monomeren Produktes fähig, wurde der Deletionsbereich um die Hälfte des zuvor entfernten Peptides verkürzt. So wurde weiter vorgegangen, bis die minimale Länge bestimmt werden konnte.

Dimere. Ausgangspunkt zur Bestimmung der kritischen Aminosäure für die Assemblierung der Untereinheiten zum dimeren LHCI-730 waren die letzten stabilen Deletionsmutanten der Monomere. Bildete diese Mutante mit dem jeweiligen Wildtyp keine Dimere mehr, wurde das Protein um die Hälfte des zuvor entfernten Peptides verlängert. War das Rekonstitutionsprodukt stabil, wurde der verbleibende Bereich weiter eingeschränkt. Bildete das Produkt keine dimeren Komplexe wurde der entscheidende Bereich wiederum um die Hälfte reduziert. Diese Vorgehensweise wurde solange durchgeführt bis die kritische Aminosäure identifiziert werden konnte. Wurde ein Dimer gebildet, wurde das Protein schrittweise (etwa fünf Aminosäuren) verkürzt. (Für die genaue Länge spielten die Eigenschaften der umliegenden Aminosäuren eine Rolle.) Diese Prozedur wurde ebenfalls bis zur Eingrenzung der kritischen Aminosäure durchgeführt.

Punktmutanten. Die Positionen der Aminosäureaustausche ergaben sich durch die Ermittlung der kürzest möglichen Deletionsmutanten. Ausgetauscht wurde, im ungekürzten Apoprotein, die erste Aminosäure, durch deren Deletion kein stabiler dimerer LHC mehr gebildet wurde. Handelte es sich dabei um Tryptophan, wurde gegen Phenylalanin, Alanin, Glycin und Histidin getauscht. Diese Aminosäuren bilden eine Reihe von Resten mit abnehmender Hydrophobizität (Engelman et al., 1986) und wurden bei ähnlichen Untersuchungen am LHCII verwendet (Kuttkat et al., 1996). War Isoleucin die kritische Aminosäure, wurde sie durch Leucin, Alanin, Histidin, Tryptophan und Phenylalanin ersetzt. Diese Reihe beinhaltet Aminosäuren mit Seitenketten mit ähnlichem apolaren Charakter (L, A) wie Isoleucin sowie schwach polare (W, F) und basische Reste (H) mit deutlich abweichenden sterischen Eigenschaften.

4.1.2 Mutantenherstellung

Die Untersuchungen zur Faltung und Stabilität monomerer Untereinheiten des LHCI-730 sowie deren Dimerassemblierung und Stabilität, wurden mittels Deletions- und Punktmutanten durchgeführt. Die Herstellung dieser Mutanten ist in Kap. 3.2.2 dieser Arbeit detailliert beschrieben. An dieser Stelle wird kurz der Ablauf der Herstellung von Deletions- und Punktmutanten aufgezeigt.

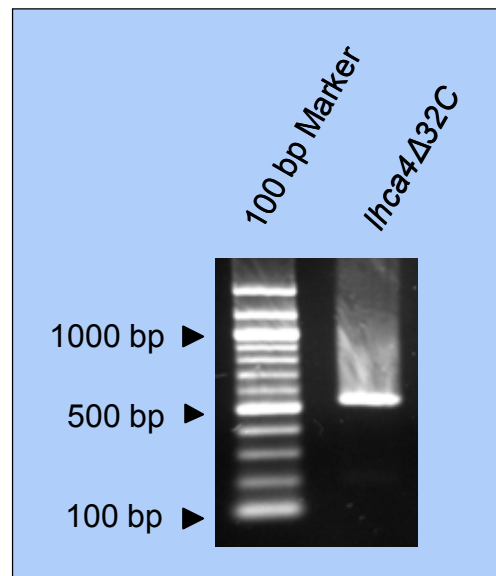


Abb. 4.1-1: Auftrennung des Amplifikats von *lhca4Δ32C* in einem 2%igen Agarosegel. Bahn 1 zeigt den 100 bp Marker (Kap. 2.4.1), Bahn 2 das PCR-Produkt nach Isopropanolfällung in der geforderten Höhe von 504 bp. Auftragsmenge: Marker, 5 μ l; PCR-Produkt, 1 μ l.

Herstellung von Deletionsmutanten

N- und C-terminal verkürzte Apoproteine wurden mittels PCR-Mutagenese generiert (Kap. 3.2.2.1). Die Produkte der Mutagenese-PCR mußten eine Länge von 603 bp (Lhca1) bzw. 600 bp (Lhca4), abzüglich der durch die Verkürzung entfernten Nukleotide, bei Auftrennung im Agarosegel aufweisen, wie dies exemplarisch für *lhca4Δ32C* in Abb. 4.1.1 gezeigt ist. Amplifikate, die der erwarteten Größe entsprachen wurden durch Isopropanol-Fällung oder Gelaufreinigung von Salzen, Proteinen und Nukleotiden (Primer, etc.) befreit (Kap. 3.2.1.3 und 3.2.1.4). Nach Quantifizierung wurde 1 μ g der amplifizierten DNA mit *Bam*HI und *Hind*III restringiert und nach Aufreinigung mittels Isopropanol-Fällung und weiterer Quantifizierung in den Vektor ligiert (Kap. 3.2.1.6 und 3.2.1.7). Der Transformation von *E. coli* JM101 Bakterien, dem Ausplattieren und der über-Nacht-Anzucht, folgte die Auswahl einzelner Kolonien (in der Regel drei Kolonien pro Platte) von der Agarplatte (Kap. 3.2.1.8). Nach einer Plasmid-Isolierung wurden die inserierten Amplifikate im Vektor durch Restriktion nachgewiesen und durch Sequenzierung die korrekte Basenfolge überprüft (Kap. 3.2.1.9). Die modifizierten cDNAs wurden überexprimiert (Kap. 3.3.1) und die Apoproteine zur Kontrolle ihrer Größe und Akkumulation in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (Kap. 3.3.3.1; Abb. 4.1-2).

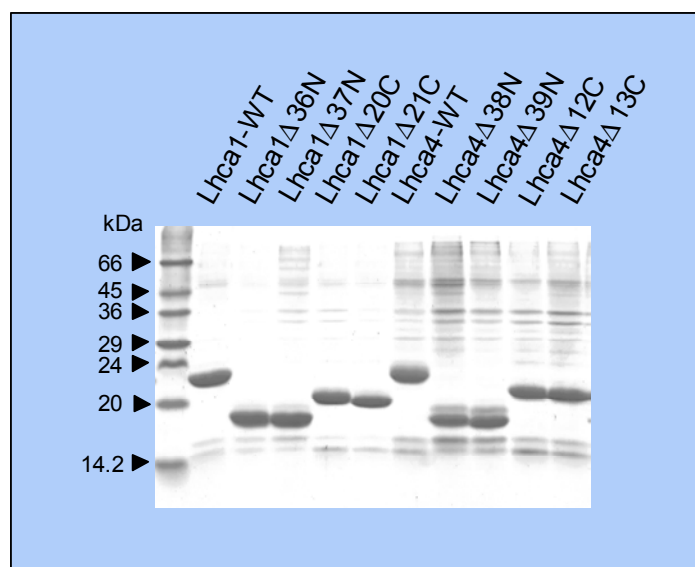


Abb. 4.1-2: Überprüfung der Proteinzusammensetzung von Einschlußkörperisolierungen durch gelelektrophoretische Auftrennung von Wildtyp und Mutanten des Lhca1 und Lhca4. Die Auftrennung erfolgte in einem voll-denaturierenden 15%igen SDS-Gel. Dargestellt sind jeweils die letzten Klone, die noch stabile Monomere bilden (Lhca1Δ36N, Lhca1Δ20C, Lhca4Δ38N, Lhca4Δ12C) und die ersten Klone, deren Rekonstitutionsprodukt im Gel nicht mehr nachweisbar war (Lhca1Δ37N, Lhca1Δ21C, Lhca4Δ39N, Lhca4Δ13C). Die linke Bahn zeigt zum Größenvergleich den Molekulargewichtstandard SDS-7 (Kap. 2.4.2). Es wurden 1.5 µg Protein pro Gelbahn aufgetragen.

Die Überexpressionsprodukte der Lhca-Klone waren gegenüber bakterieneigenen Proteinen deutlich angereichert (Abb. 4.1-2). Da durch die, der Einschlußkörperisolierung angeschlossene, Aufreinigung mit Detergentien (Kap. 3.3.1) nicht alle bakterieneigenen Proteine entfernt wurden, waren im Hintergrund zu einem geringen Anteil auch *E. coli*-Proteine sichtbar.

Die am N-Terminus von Lhca4Δ38N und Lhca4Δ39N deutlich sichtbaren Doppelbanden knapp oberhalb der Bande der überexprimierten Deletionsmutante werden auf die Anwesenheit eines weiteren Stopkodons zurückgeführt. Das längere Produkt tritt vermutlich auf, wenn das erste Stopkodon überlesen wird (Schmid et al., 1997).

Herstellung von Punktmutanten

Für den Einbau ortsspezifischer Mutationen wurden in der Regel zwei PCR-Läufe¹⁷ benötigt. Die erste PCR diente dazu, ein kurzes Fragment inklusive der modifizierten Basenfolge herzustellen. PCR2 war nötig, um den vollständigen DNA-Strang zu synthetisieren. In Abbildung 4.1-3 sind die Ergebnisse am Beispiel von *lhca4W39F* demonstriert. Die Fragmente aus der ersten PCR waren in der Regel etwa 100 bp lang. Ihre Größe wurde über ein Agarosegel kontrolliert (Abb. 4.1-3A).

¹⁷ Eine Ausnahme war die Herstellung der N-terminalen Punktmutanten des Lhca1. Weil der zu verändernde Sequenzabschnitt sehr nahe am 5'-Ende der cDNA liegt, konnte direkt durch Verwendung eines entsprechend zusammengesetzten Vorwärtsprimers mit nur einem PCR-Lauf die gesamte cDNA amplifiziert werden.

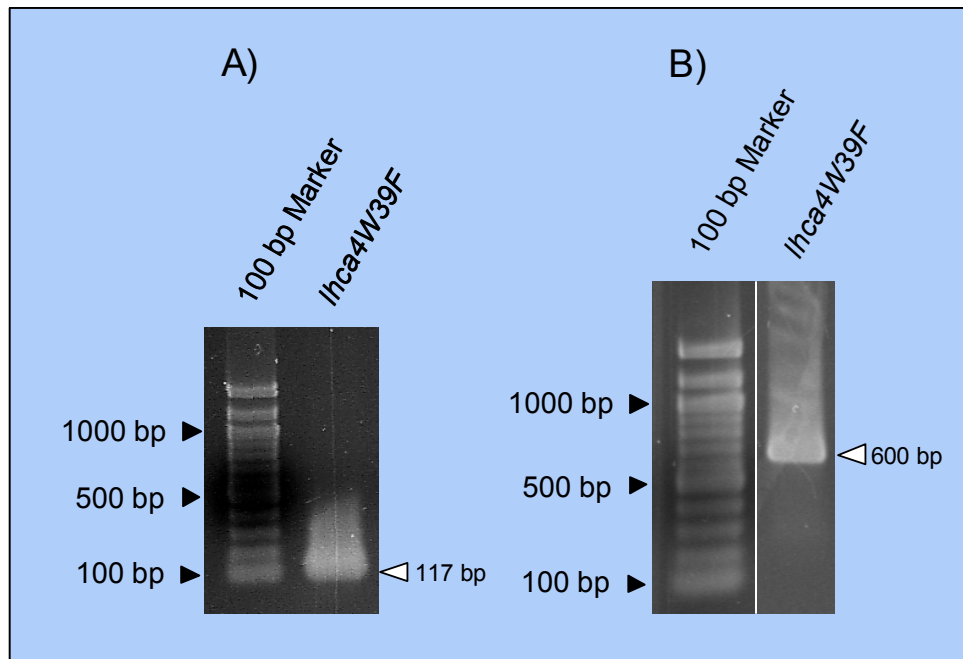


Abb. 4.1-3: Überprüfung der PCR-Produkte nach ortsgerichteter Mutagenese am 3'-Ende des *Ihca4* durch Agarosegel-Auftrennung (1.2%). A) Amplifikat aus PCR1. B) Produkt der Amplifikation von PCR2. Auftragsmenge: Marker, 5 μ l; PCR-Produkte, Gel A, 10 μ l, Gel B, 1 μ l.

Das Produkt aus PCR1 wurde als Primer in die zweite PCR eingesetzt. Die Kontrolle des dabei erhaltenen Produktes erfolgte wiederum durch ein Agarosegel (Abb. 4.1-3B). Da die Länge der Matrize nicht verändert wurde, mußte das Produkt der zweiten PCR wieder die Originallänge des Wildtyps haben. Der Einbau in den Vektor erfolgte in gleicher Weise wie bei der Herstellung der Deletionsmutanten.

Die Restriktionskontrolle des Inserteinbaus nach durchgeführter Transformation fand in zwei Schritten statt. Schritt 1: Die Restriktion des Inserts mit *BamHI* und *HindIII* diente der Auswahl von Klonen mit Insert. Schritt 2: Gleichzeitig mit dem Austausch des Kodons für die neue Aminosäure wurde eine in der Nähe liegende Restriktionsschnittstelle, ohne Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz, gelöscht. Über das spezifische Fragmentmuster im Agarosegel konnten positive Klone selektiert werden (Abb. 4.1-4). Die Abbildung zeigt, daß durch die Veränderung des *XmnI*-Kodons die DNA an dieser Position nicht mehr geschnitten werden konnte, so daß anstelle der beiden kurzen Fragmente von 634 bp und 489 bp ein längeres Produkt mit 1123 bp resultierte. Die nicht benannten hochmolekularen Banden entstammten Laufkonformeren von ungeschnittenem Vektor.

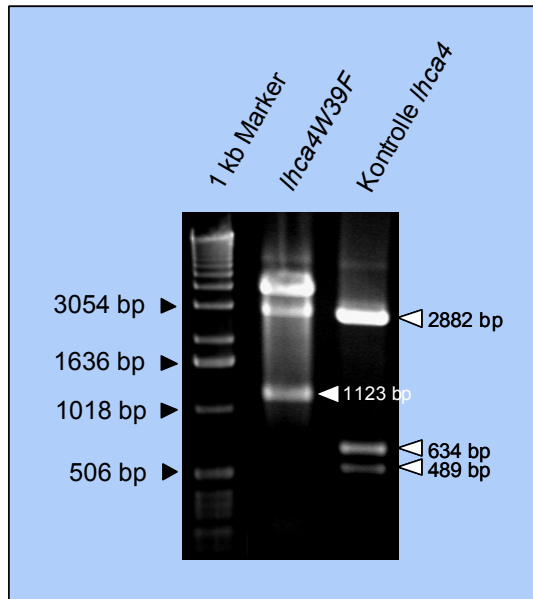


Abb. 4.1-4: Überprüfung der bei Modifikation der cDNA-Sequenz gelöschten Restriktionsschnittstellen. Exemplarische Darstellung für die ortsspezifische Mutante *lhca4W39F*. Die in den Gelen markierten (Pfeil) Banden entsprechen den in Tabelle 3.2-5 (Kap. 3.2.1.9) geforderten Fragmentgrößen. Auftragsmengen: 1 kb Marker; 5 μ l, Proben, 7.5 μ l (aus 15 μ l Restriktionsansatz).

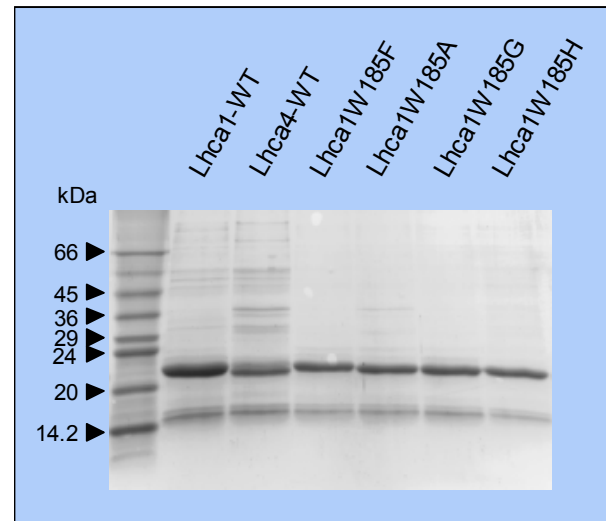


Abb. 4.1-5: Überprüfung der Proteinzusammensetzung von Einschlusskörperisolierungen der C-terminalen Punktmutanten von Lhca1 durch gelelektrophoretische Auftrennung. Die Auftrennung erfolgte in einem voll-denaturierenden 15%igen SDS-Gel. Die linke Bahn zeigt zum Größenvergleich den Molekulargewichtsstandard SDS-7 (Kap. 2.4.2). Daneben sind, zum Vergleich der Proteinakkumulation die Wildtypen beider Apoproteine, und die Punktmutanten aufgetragen. Auftragsmenge: 1.5 μ g Protein pro Gelbahn.

Die Klone wurden ebenfalls durch Sequenzierung hinsichtlich zufälliger Mutationen untersucht. Das überexprimierte Genprodukt wurde nach Größe und Proteinakkumulation im Polyacrylamidgel untersucht. Die Banden des Lhca1-Wildtyps und dessen C-terminale Punktmutanten zeigen gleiches Laufverhalten (Abb. 4.1-5).

4.2 *In vitro* Rekonstitution und Stabilitätsprüfung monomerer Komplexe von Lhca1 und Lhca4 durch schwach denaturierende LDS-PAGE

Die Einschlußkörper-Präparationen konnten aufgrund der hohen Anreicherung der Lhca-Proteine ohne weitere Reinigungsschritte für die Rekonstitution eingesetzt werden. Die Rekonstitution erfolgte wie in 3.4.1 beschrieben.

4.2.1 Bedeutung der N- und C-Termini für die Stabilität von Lhca1 und Lhca4

Die Deletionsmutanten mit minimaler Länge, die gerade noch stabile monomere Komplexe bilden (Minimalmutanten), wurden durch die Herstellung einer Reihe von Deletionsmutanten sukzessive ermittelt (Kap. 4.1.1).

In den folgenden Tabellen (Tab. 4.2-1 und 4.2-2) sind sowohl die für Ermittlung der Minimalmutanten wichtigen Proteine dargestellt als auch die ersten Deletionsmutanten, die keinen stabilen Pigment-Protein-Komplex bildeten. Durch den Vergleich mit der jeweiligen Wildtyp-Sequenz wird dabei der Umfang der Deletion deutlich.

Die Abbildung 4.2-1 dokumentiert die Ergebnisse der Auftrennung monomerer Rekonstitutionsprodukte von Lhca1 und Lhca4 im schwach denaturierenden Gelsystem.

Tab 4.2-1: Tabellarische Übersicht der A) N- und B) C-terminalen Deletionsmutanten des Lhca1 im Vergleich mit dem Wildtyp. Die grau unterlegten Sequenzen markieren die Bereiche der nach Green und Pichersky (1994) angenommen Transmembranhelices. „+“ bedeutet: Komplexbande auf Höhe der Wildtypkomplexbande, „-“ keine Bande sichtbar. Die hochgestellten Zahlen bezeichnen die Positionen der Aminosäuren in der Wildtypsequenz. Aus klonierungstechnischen Gründen besitzen alle Mutanten am N-Terminus zusätzlich die Aminosäuren MRGS.

A) N-terminale Deletionsmutanten des Lhca1

Klon	Sequenz		Rekonstitution
Wildtyp	MRGS ¹ SADWMPGQPRPSYLDGSAPGDFGFDPLGLGEVPA	NLERYKE ⁴¹ ...	+
Lhca1Δ34N	1	NLERYKE ⁴¹ ...	+
Lhca1Δ36N	1	ERYKE ⁴¹ ...	+
Lhca1Δ37N	1	RYKE ⁴¹ ...	-
Lhca1Δ38N	1	YKE ⁴¹ ...	-

B) C-terminale Deletionsmutanten des Lhca1

Klon	Sequenz		Rekonstitution
Wildtyp	... ¹⁶⁹ PGTG PL	ENLATHLADPW ^{HNNIGDVIIPKGI} FPN ²⁰¹	+
Lhca1Δ16C	... ¹⁶⁹ PGTG PL	ENLATHLADPW ²⁰¹	+
Lhca1Δ19C	... ¹⁶⁹ PGTG PL	ENLATHLA ²⁰¹	+
Lhca1Δ20C	... ¹⁶⁹ PGTG PL	ENLATHL ²⁰¹	+
Lhca1Δ21C	... ¹⁶⁹ PGTG PL	ENLATH ²⁰¹	-
Lhca1Δ22C	... ¹⁶⁹ PGTG PL	ENLAT ²⁰¹	-
Lhca1Δ29C	... ¹⁶⁹ PGTG	²⁰¹	-

Lhca1. Eine Deletion der kompletten extrinsischen Region (Lhca1 Δ 34N) am N-Terminus des Lhca1 führte zwar zu einer Abnahme von stabilen Rekonstitutionsprodukten gegenüber dem Wildtyp, dennoch konnten in schwach denaturierenden Gelen für diese und die zwei folgenden Deletionsmutanten monomere LHCs nachgewiesen werden. Erst die Mutante Lhca1 Δ 37N faltet sich nach Entfernung eines Glutamats nicht mehr zu stabilen Monomeren (Abb. 4.2-1A). Am C-Terminus des Lhca1 war keine Entfernung der Aminosäuren bis zum Ende der dritten Transmembranhelix möglich (Abb. 4.2-1A, Lhca1 Δ 29C). Die folgende schrittweise Verlängerung des Apoproteins zeigte, daß schon nach einer Deletion von drei Aminosäuren – mit Entfernung eines Leucins – in der vierten amphipathischen Helix (Lhca1 Δ 21C) die Bildungsfähigkeit von stabilem rekombinantem Lhca1 erlosch (Abb. 4.2-1A). Die Monomerausbeute nahm über diesen Bereich hinweg stetig ab (Daten nicht gezeigt).

Tab 4.2-2: Tabellarische Übersicht der A) N- und B) C-terminalen Deletionsmutanten des Lhca4 im Vergleich mit dem Wildtyp. Die Legende ist Tab. 4.2-1 zu entnehmen.

A) N-terminale Deletionsmutanten des Lhca4

Klon	Sequenz		Rekonstitution
Wildtyp	MRGS ⁺ KKGQWLPGLASPDYLDGSLSGDNGFDPLGLVEDPE	NLKWFIQA ⁴³ ...	+
Lhca4 Δ 35N	1	NLKWFIQA ⁴³ ...	+
Lhca4 Δ 37N	1	KWFIQA ⁴³ ...	+
Lhca4 Δ 38N	1	WFIQA ⁴³ ...	+
Lhca4 Δ 39N	1	FIQA ⁴³ ...	-
Lhca4 Δ 40N	1	IQA ⁴³ ...	-
Lhca4 Δ 42N	1	A ⁴³ ...	-

B) C-terminale Deletionsmutanten des Lhca4

Klon	Sequenz				Rekonstitution
Wildtyp	... ¹⁶⁷ FIVQHNVTKGK	PF	DNLLQHLSDP	WHNTIIQTLSN ²⁰⁰	+
Lhca4 Δ 10C	... ¹⁶⁷ FIVQHNVTKGK	PF	DNLLQHLSDP	W ²⁰⁰	+
Lhca4 Δ 12C	... ¹⁶⁷ FIVQHNVTKGK	PF	DNLLQHLS	²⁰⁰	+
Lhca4 Δ 13C	... ¹⁶⁷ FIVQHNVTKGK	PF	DNLLQHLS	²⁰⁰	-
Lhca4 Δ 16C	... ¹⁶⁷ FIVQHNVTKGK	PF	DNLLQ	²⁰⁰	-
Lhca4 Δ 25C	... ¹⁶⁷ FIVQHNVTK			²⁰⁰	-

Lhca4. Auch am Lhca4 ist die Verkürzung des Apoproteins über den extrinsischen N-Terminus (Lhca4 Δ 35N) hinaus möglich, ohne die Bildungsfähigkeit stabiler monomerer Pigment-Protein-Komplexe zu verlieren (Abb. 4.2-1B). Die N-terminal maximal verkürzte Mutante (Lhca4 Δ 38N) zeigte nach elektrophoretischer Auftrennung eine etwas schwächere Monomerbande als der Wildtyp. Das Produkt war noch deutlich im Gel nachweisbar (Abb. 4.2-1B). Die Entfernung der folgenden Aminosäure Tryptophan (Lhca4 Δ 39C) führte zum kompletten Verlust von Rekonstitutionsprodukten. (Bei den kürzeren N-terminalen Mutanten des Lhca4 trat häufig eine höhermolekulare Pigment und Protein enthaltende Bande auf. Diese wurde aus Gründen der Übersicht in der Abbildung 4.2-1B entfernt.)

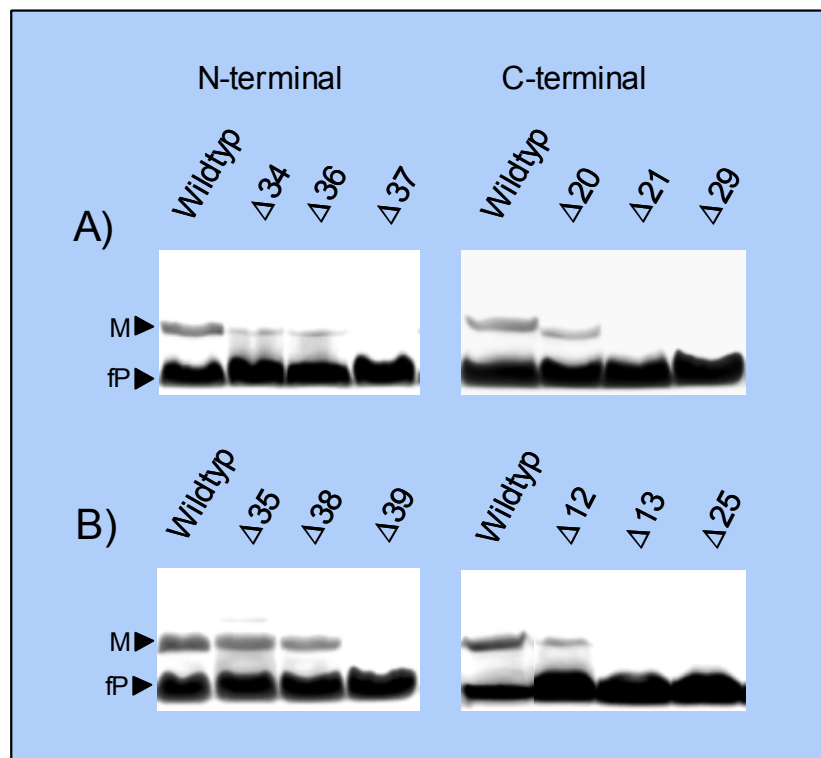


Abb. 4.2-1: Effekt von N- und C-terminalen Deletionen auf die Bildung stabiler monomerer Komplexe von A) Lhca1 und B) Lhca4. Dargestellt sind die Proteine, die noch stabile Komplexe bilden (Lhca1 Δ 36N, - Δ 20C; Lhca4 Δ 38N, - Δ 12C), die als erste keine Banden mehr zeigen (Lhca1 Δ 37N, - Δ 21C; Lhca4 Δ 39N, Δ 13C) und die Proteine, die bis zum Anfang bzw. Ende der Transmembranhelices verkürzt sind (Lhca1 Δ 34N, - Δ 29C; Lhca4 Δ 35N, - Δ 25C; Green und Pichersky, 1994). Die aufgeführten Komplexe wurden in einem 12%igen, schwach denaturierenden Gel aufgetrennt. M - Monomer; fP - freies Pigment.

Nach C-terminaler Deletion von 25 Aminosäuren (Lhca4 Δ 25C) – einschließlich der vierten amphipathischen Helix, bis zum Ende der dritten Transmembranhelix – war kein stabiler Lhca4 Pigment-Protein-Komplex mehr nachweisbar. Die Mutante Lhca4 Δ 12C wurde als letzte stabile C-terminal verkürzte Mutante des Lhca4 ermittelt.

4.2.2 Biophysikalische Charakterisierung von Lhca1, Lhca4 und deren maximal verkürzten Deletionsmutanten

Der Nachweis eines Pigment-Protein-Komplexes nach Auftrennung in einem schwach denaturierenden Gel beweist nur, daß dieses Apoprotein zu einem ausreichend stabilen LHC faltet. Veränderungen in der hochspezifischen Anordnung von Pigmenten, insbesondere der beiden Chlorophyllspezies, aber auch Verluste von Chromophoren, die die Stabilität nicht beeinflussen, sind nicht erkennbar. Die Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie sind zweckmäßige Methoden zur Identifizierung verschiedener Wechselwirkungen von Pigmenten im Protein und ihrer Orientierung im Raum.

4.2.2.1 77 K Fluoreszenzemissionsspektroskopie

Lichtsammelkomplexe leiten ihre Anregungsenergie normalerweise an die Photosysteme und deren Reaktionszentren weiter, wo die primäre Ladungstrennung stattfindet. Innerhalb der Lichtsammelantennen, an die u.a. Chl *a* und *b* gebunden sind, absorbieren beide Chlorophylle Licht geeigneter Anregungswellenlänge und speichern diese kurzfristig in Form von elektronischer Anregungsenergie. Diese Energie wird schließlich über Chl *a* an das Reaktionssystem weitergegeben.

Man beobachtet am isolierten nativen oder rekombinanten LHCI-730 (und den Untereinheiten) eine Fluoreszenzemission von proteingebundenen Chl *a* Molekülen im intakten Komplex (Schmid et al., 1997; Melkozernov et al., 1998). Spezifisches Anregungslicht für Chl *a* (440 nm) oder Chl *b* (470 nm) macht es möglich, die Energieweitergabe innerhalb der Chl *a*, aber auch von Chl *b* auf Chl *a* Moleküle zu untersuchen. Die Fluoreszenzemission ist für die einzelnen LHCI-Proteine charakteristisch. Bei 77 K emittiert der monomere Lhca1 bei 685 nm und der monomere Lhca4 bei 725 nm (Tjus et al., 1995; Schmid et al., 1997). Treten in den Komplexen durch Deletion Veränderungen in der Proteinstruktur auf, die eine Verschiebung der Pigmentausrichtung oder gar einen Pigmentverlust nach sich ziehen, könnte dies im Spektrum sichtbar werden.

Die im folgenden gezeigten Spektren wurden bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm aufgenommen. Bei dieser Wellenlänge wird Chl *b* im Pigment-Protein-Komplex angeregt. Wenn eine Energieweiterleitung von Chl *b* auf Chl *a* möglich ist, setzt das eine bestimmte räumliche Organisation der Chlorophylle voraus. Entspricht das Fluoreszenzemissionsspektrum des modifizierten LHCs dem des Wildtyps, kann angenommen werden, daß der Pigment-Protein-Komplex ähnlich dem Wildtyp gefaltet ist.

In den Graphiken (Abb. 4.2-2 und 4.2-3) werden die Wildtypspektren denen der jeweiligen Minimalprotein-Komplexe gegenübergestellt.

Lhca1 und dessen Deletionsmutanten

Vergleicht man das Spektrum des Lhca1-Wildtyps mit denen der Deletionsmutanten, so stellt man fest, daß diese fast identisch sind. Wie aus den Spektren ersichtlich ist (Abb. 4.2-2), weisen sie alle ein Maximum bei ~685 nm auf. Eine geringe Abweichung zeigte sich bei der N-terminalen Mutante Lhca1 Δ 36N durch eine erhöhte Emission bei 652 nm.

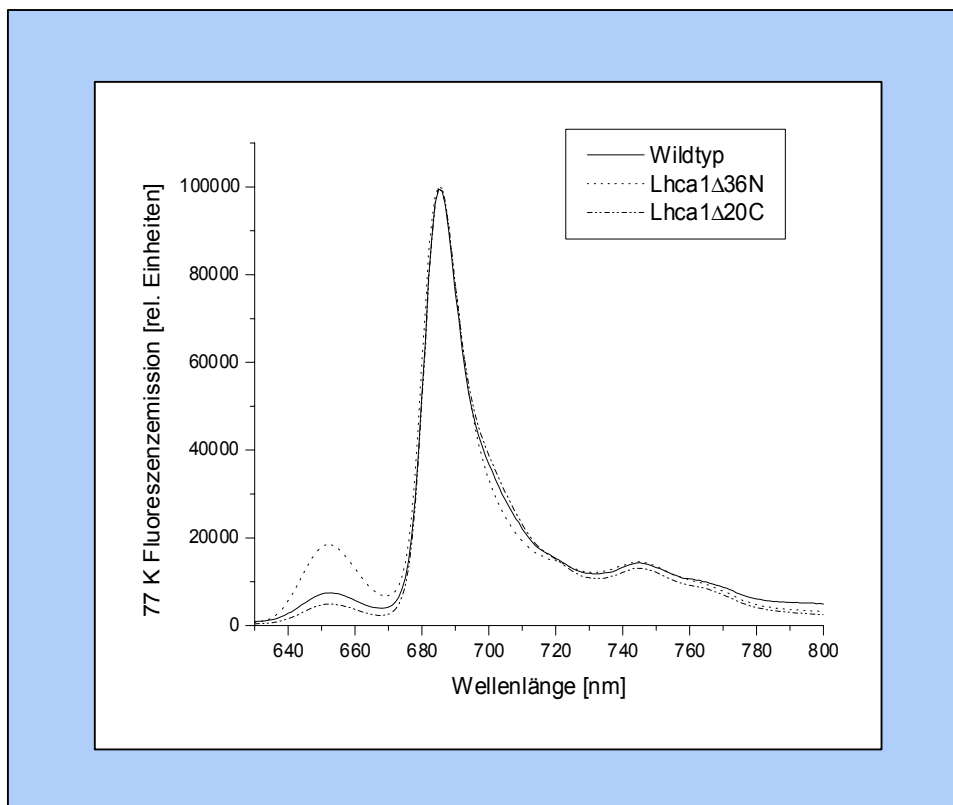


Abb. 4.2-2: 77 K Fluoreszenzemissionsspektren von Lhca1. Die Graphik zeigt die Spektren von Lhca1-Wildtyp im Vergleich zu den Spektren der Minimalmutanten von N- (Lhca1Δ36N) und C-Terminus (Lhca1Δ20C). Die Spektren wurden auf gleiche Amplituden normiert und sind Mittelwerte aus mindestens drei Messungen. Anregungswellenlänge: 470 nm.

Lhca4 und dessen Deletionsmutanten

Im Vergleich der maximalen N- und C-terminalen Deletionsmutanten des Lhca4 mit dem Wildtyp war eine deutliche Veränderung im Kurvenverlauf des Emissionsspektrums der N-terminalen Mutante Lhca4Δ38N zu erkennen (Abb. 4.2-3). Das Maximum bei 725 nm war deutlich reduziert. Ebenso bildete sich ein im Wildtyp nicht vorhandenes Maximum bei 686 nm. Die Fluoreszenzemission von ungekoppeltem Chl *b* (652 nm) nahm in geringem Maße zu. Die C-terminale Mutante Lhca4Δ12C war abgesehen von einer geringer ausgeprägten Schulter bei 690 nm und einer leichten Zunahme an partiell unstrukturiertem Chl *b* identisch mit dem Emissionsverhalten des Lhca4-Wildtyps.

4.2.3 Biochemische Charakterisierung der letzten monomerbildenden Lhca-Mutanten

Die Bestimmung der Chl *a/b*-Verhältnisse ermöglicht die Ermittlung von Veränderungen in der Chlorophyllzusammensetzung im Pigment-Protein-Komplex. Der Vergleich mit den Ergebnissen der Gelaufentrennungen rekonstituierter mutierter LHCs zum einen und den Resultaten der spektroskopischen Untersuchungen zum anderen, läßt ein detailliertes Gesamtbild der untersuchten Lichtsammelkomplexe entstehen.

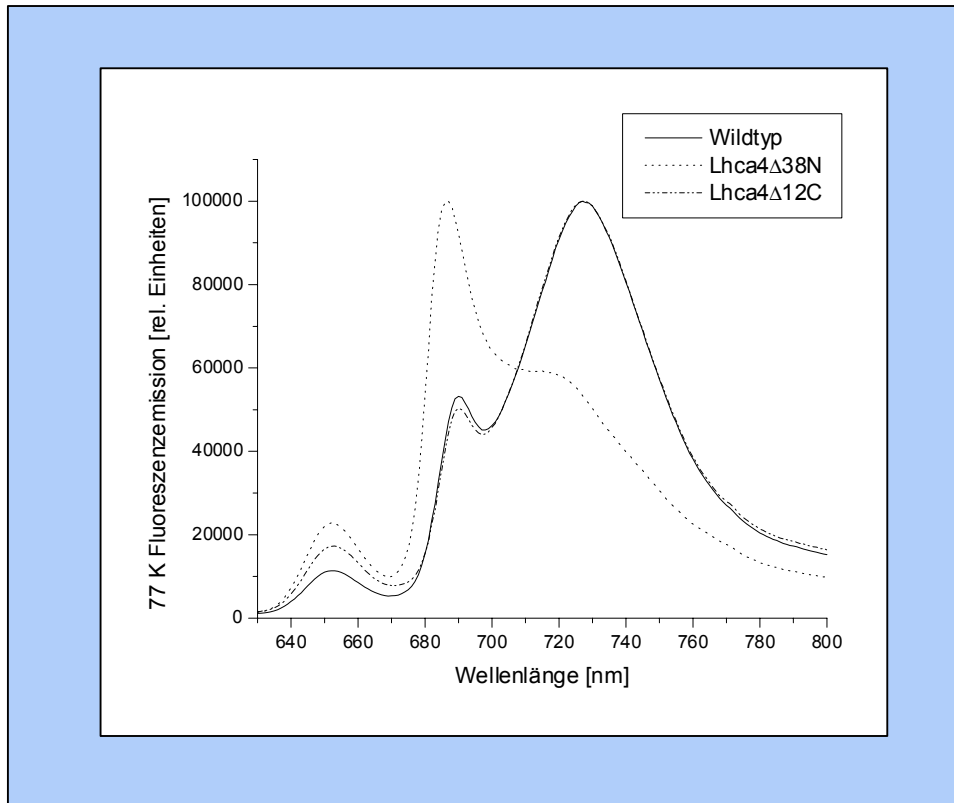


Abb. 4.2-3: 77 K Fluoreszenzemissionsspektren von Lhca4. In der Graphik werden die Spektren von Lhca4-Wildtyp mit den Spektren der Minimalmutanten (Lhca4Δ38N, Lhca4Δ12C) des N- und C-Terminus des Lhca4 verglichen. Die Spektren wurden auf gleiche Amplituden normiert und sind Mittelwerte aus mindestens drei Messungen. Anregungswellenlänge: 470 nm.

4.2.3.1 Einfluß der Deletionen auf die Chlorophyll *a/b*-Verhältnisse der letzten stabilen LHC-Mutanten

Um zu untersuchen, ob die Entfernung von Aminosäuren an den Termini von Lhca1 und Lhca4 die Bindung von Chlorophyllen beeinflusst, wurde das Chl *a/b*-Verhältnis der kritischen Deletionsmutanten photometrisch bestimmt und mit der Stöchiometrie der Wildtyp-LHCs verglichen (Tab. 4.2-1). Die Gegenüberstellung der Lhca1-Mutanten zeigte, daß das Verhältnis der beiden Chlorophyllspezies zueinander durch eine Verkürzung der Apoproteine nicht beeinflusst wird. Der Lhca1-Wildtyp hat ein Chl *a/b*-Verhältnis von 3.35 von dem die Mutanten Lhca1Δ36N und Lhca1Δ20C mit 3.26 respektive 3.22 kaum abweichen (Tab. 4.2-3).

Die Deletionsmutanten des Lhca4 wiesen im Falle der Mutante Lhca4Δ12C eine geringe Verschiebung in der Chl *a/b*-Stöchiometrie auf (Lhca4-Wildtyp, 2.6; Lhca4Δ12C, 2.37). Die Verkürzung am N-Terminus hatte dagegen keinen Effekt. Das Protein Lhca4Δ38N komplexierte die beiden Chlorophyllspezies fast im gleichen Verhältnis (2.64) wie der Lhca4-Wildtyp (2.60; Tab. 4.2-3).

Tab. 4.2-3: Chl *a/b*-Verhältnis von Wildtyp und Deletionsmutanten des Lhca1 und Lhca4. Die Größe der Standardabweichung berechnet sich aus der Varianz von drei bzw. vier Messungen.

Lhca1			Lhca4		
Wildtyp	$\Delta 36N$	$\Delta 20C$	Wildtyp	$\Delta 38N$	$\Delta 12C$
3.35 ± 0.06	3.26 ± 0.09	3.22 ± 0.09	2.60 ± 0.06	2.64 ± 0.03	2.37 ± 0.08

4.2.3.2 Einfluß der Deletionen auf die Pigmentzusammensetzung der letzten stabilen LHC-Mutanten

Durch HPLC-Auftrennungen der aus den LHC-Monomeren isolierten Pigmenten und Normierung auf ein Mol Lutein¹⁸, ist es möglich, den Verlust von Chromophoren im LHC zu detektieren.

Die ermittelten Werte für den Lhca1 und dessen Deletionsmutanten zeigten ein konstant gleiches Chl *a/b* Verhältnis von etwa 3.4. Der Chl *a*- und Chl *b*-Gehalt der Deletionsmutante Lhca1 $\Delta 36N$ (Chl *a*, 7.6; Chl *b*, 2.25) war gegenüber dem Lhca1-Wildtyp, bei gleichbleibendem Chlorophyll-Verhältnis, deutlich erhöht. Die Chlorophyll-Mengen des Lhca1 $\Delta 20C$ waren nur in geringem Maße erhöht. Die Verhältnisse der beiden Xanthophylle Violaxanthin und Neoxanthin waren in Wildtyp und Deletionsmutante des Lhca1, bis auf einen schwach angestiegenen Violaxanthin-Gehalt der Mutante Lhca1 $\Delta 20C$, kaum verändert (Tab. 4.2-4).

Die Chl-Verhältnisse im Lhca4 und seinen Mutanten differierten ebenfalls kaum. Das Chl *a/b*-Verhältnis von 2.77 (Lhca4-Wildtyp) und 2.83 bei Lhca4 $\Delta 38N$ spiegelt nur geringe Unterschiede im Verhältnis der Chlorophylle zueinander wider. Allerdings hatte die N-terminale Mutante einen um 0.69 niedrigeren Chl *a+b*-Gehalt. Dieser war bei der C-terminalen Mutante Lhca4 $\Delta 12C$ (9.2) ebenso gegenüber dem Lhca4-Wildtyp (8.35) erhöht und fast gleich mit Lhca4 $\Delta 38N$ (9.04). Lhca4 $\Delta 12C$ wies zusätzlich die stärkste Abweichung im Chl *a/b*-Verhältnis gegenüber dem Wildtyp auf, was hauptsächlich auf eine nicht proportional zum Chl *a*-Gehalt erhöhte Chl *b*-Menge zurückzuführen ist. Innerhalb der Lhca4-LHCs variierten die gemessenen Xanthophyll-Mengen stärker als beim Lhca1 und seinen Deletionsmutanten. Dies kann in der geringen Anzahl an Versuchswiederholungen und den sub-stöchiometrischen Mengen dieser Pigmente begründet sein (Tab. 4.2-4).

Tab. 4.2-4: Tabellarische Darstellung der Pigmentzusammensetzung der noch stabile monomere LHCs bildenden Mutanten von Lhca1 und Lhca4 (angegeben in mol/mol Lutein). Die Ermittlung der Daten erfolgte durch HPLC-Analyse und basiert auf maximal zwei unabhängigen Messungen.

	Violaxanthin	Neoxanthin	Chlorophyll <i>a</i>	Chlorophyll <i>b</i>	Chl <i>a+b</i>	Chl <i>a/b</i>
Lhca1	0.24 ± 0.008	0.19 ± 0.002	$5.64 \pm 0,383$	$1.67 \pm 0,004$	7.31 ± 0.387	3.38 ± 0.12
Lhca1 $\Delta 36N$	0.20 ± 0.003	0.20 ± 0.005	$7.6 \pm 0,436$	$2.25 \pm 0,196$	9.85 ± 0.632	3.38 ± 0.05
Lhca1 $\Delta 20C$	0.35 ± 0.036	0.18 ± 0.018	$5.81 \pm 0,174$	$1.73 \pm 0,099$	7.54 ± 0.273	3.37 ± 0.05
Lhca4	0.61	0.12	6.13	2.22	8.35	2.77
Lhca4 $\Delta 38N$	0.16 ± 0.000	0.20 ± 0.005	$6.68 \pm 0,118$	$2.36 \pm 0,078$	9.04 ± 0.196	2.83 ± 0.02
Lhca4 $\Delta 12C$	0.45 ± 0.436	0.03 ± 0.006	$6.65 \pm 0,658$	$2.55 \pm 0,372$	9.2 ± 1.03	2.62 ± 0.12

¹⁸ Die Normierung erfolgt auf Lutein, da aus früheren Arbeiten (Schmid et al., 1997, Croce et al., 1998) die Bindung von einem Lutein pro Untereinheit (Lhca1 oder Lhca4) angenommen werden kann.

4.3 *In vitro* Rekonstitution und Stabilitätsuntersuchungen am LHCI-730

Die Stabilität der monomeren Untereinheiten wurde als Voraussetzung zur Bildung dimerer LHCs aus den Untereinheiten angesehen. Daneben müssen beide Untereinheiten Strukturen und Interaktionsmöglichkeiten besitzen, die eine spezifische Wechselwirkung beider Proteine möglich macht. Durch sukzessive Verkürzung jeweils einer Untereinheit sollten Strukturelemente oder Aminosäuren an den Proteintermini identifiziert werden, die an Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten beteiligt sind (Kapitel 4.3.1).

Analog der Vorgehensweise zur Bestimmung der Minimalmutanten der monomeren LHCs, wurde jeweils an N- oder C-Terminus deletiert bis das kürzest mögliche Protein, das mit dem Wildtyppartner dimerisiert, gefunden wurde. Nach der Bestimmung dieser Minimaldimermutante, wurde durch punktspezifische Mutationen die Bedeutung der kritischen Aminosäure im Vollängenprotein näher untersucht (Kap. 4.3.2). Das bedeutet, daß unter Beibehaltung der Originallänge des Proteins die Aminosäure, die an letzter Position der letzten dimerbildenden Deletionsmutante an N- und C-Terminus stand, ausgetauscht wurde. Die Dimer-Bildungsfähigkeit dieser Punktmutanten soll Aufschluß über den Einfluß dieser Aminosäure auf die Dimerisierung unabhängig vom restlichen Terminus geben.

4.3.1 Dimerisierungsfähigkeit der Deletionsmutanten

Die Strategie zur Ermittlung der kürzest möglichen dimerisierungsfähigen Deletionsmutanten an N- und C-Terminus beider Untereinheiten ist in Kapitel 4.1.1 beschrieben worden.

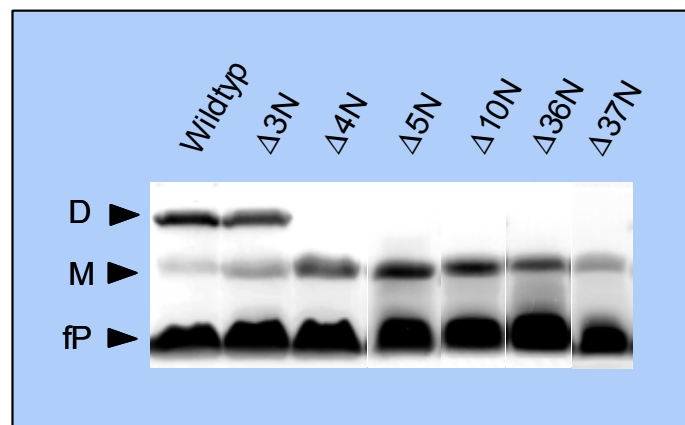


Abb 4.3-1: Auswirkung N-terminaler Deletionen auf die Bildung stabiler dimerer Komplexe des Lhca1 im Standard-Dimerisierungsverfahren (Wildtyp + Deletionsmutante). Die Auftrennung erfolgte elektrophoretisch in einem schwach denaturierenden Gel. D, Dimer; M, Monomer; fP, freies Pigment.

Lhca1. Ausgehend von der Mutante Lhca1Δ36N¹⁹, die keine Dimere mit dem Lhca4 bilden konnte (Abb. 4.3-1), wurde der N-Terminus sukzessive weiter verlängert (Kap. 4.1.1). Die im weiteren generierten Mutanten Lhca1Δ10N und -Δ5N waren beide nicht in der Lage mit dem Lhca4 zu assemblieren (Abb. 4.3-1). Erst die Mutante Lhca1Δ3N zeigte nach Elektrophorese im schwach denaturierenden Polyacrylamid-Gel wieder eine Dimerbande.

¹⁹ Lhca1Δ36N war die letzte Mutante, die Monomere bilden konnte und damit Ausgangspunkt für die Dimer-Untersuchungen (Kap. 4.1.1).

Die Dimerisierungseffizienz des Lhca1Δ3N – bestimmt über die Färbungsintensität der Banden im Vergleich zum Wildtyp – unterschied sich bei dieser Mutante nur in geringem Maße vom Wildtyp-Dimer (Abb. 4.3-1). Um die Aminosäure zu identifizieren, bei deren Deletion die Bildung von Lhca1-Lhca4-Dimeren nicht mehr möglich ist, wurde die Mutante Lhca1Δ4N rekonstituiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Mit der Deletion des Tryptophans in dieser Mutante (Tab. 4.3-1) war, wie Abbildung 4.3-1 zeigt, keine Dimerbildung mehr möglich.

Tab. 4.3-1 Tabellarische Übersicht der Deletionsmutanten des Lhca1 im Hinblick auf ihre Dimerisierungsfähigkeit. A) N- und B) C-terminale Deletionsmutanten des Lhca1. Die grau unterlegten Sequenzen markieren die Bereiche der nach Green und Pichersky (1994) angenommen Transmembranhelices. „+“, bildet Dimerbande; „-“ keine Dimerbande sichtbar. Die hochgestellten Zahlen bezeichnen die Positionen der Aminosäuren in der Wildtypsequenz. Aus klonierungstechnischen Gründen besitzen alle Apoproteine am N-Terminus zusätzlich die Aminosäuren MRGS. Rot unterlegt sind die jeweiligen Dimerminimalmutanten; grün unterlegt, die Proteine, die in den Monomer-Rekonstitutionsuntersuchungen als Minimalmutanten rekonstituierten.

A)

Klon	Sequenz		Dimer
Wildtyp	MRGS ¹ SADWMPGQPRPSYLDGSAPGDFGFDPLGLGEVPA	NLERYKE ⁴¹ ...	+
Lhca1Δ3N	¹ W MPGQPRPSYLDGSAPGDFGFDPLGLGEVPA	NLERYKE ⁴¹ ...	+
Lhca1Δ4N	¹ MPGQPRPSYLDGSAPGDFGFDPLGLGEVPA	NLERYKE ⁴¹ ...	-
Lhca1Δ5N	¹ PGQPRPSYLDGSAPGDFGFDPLGLGEVPA	NLERYKE ⁴¹ ...	-
Lhca1Δ10N	¹ PSYLDGSAPGDFGFDPLGLGEVPA	NLERYKE ⁴¹ ...	-
Lhca1Δ36N	¹	ERYKE ...	-
Lhca1Δ37N	¹	RYKE ⁴¹ ...	-

B)

Klon	Sequenz		Dimer
Wildtyp	... ¹⁶⁹ PGTG PL	ENLATHLADP WHNNIGDVIIPKGIFPN ²⁰¹	+
Lhca1Δ13C	... ¹⁶⁹ PGTG PL	ENLATHLADP WHNN ²⁰¹	+
Lhca1Δ14C	... ¹⁶⁹ PGTG PL	ENLATHLADP WHN ²⁰¹	+
Lhca1Δ15C	... ¹⁶⁹ PGTG PL	ENLATHLADP WH ²⁰¹	+
Lhca1Δ16C	... ¹⁶⁹ PGTG PL	ENLATHLADP W ²⁰¹	+
Lhca1Δ17C	... ¹⁶⁹ PGTG PL	ENLATHLADP ²⁰¹	-
Lhca1Δ20C	... ¹⁶⁹ PGTG PL	ENLATHL ²⁰¹	-

Die Untersuchungen zur Identifizierung der letzten dimerbildenden Mutante am C-Terminus des Lhca1 starteten mit Lhca1Δ20C, dem letzten monomerbildenden Protein. Diese Mutante bildete keine Dimere. Durch schrittweise Verlängerung des Proteins konnte herausgefunden werden, daß die Deletion von maximal 16 Aminosäuren (Lhca1Δ16C, Position 185) unter Beibehaltung der Dimerisierungsfähigkeit möglich war (Abb. 4.3-2).

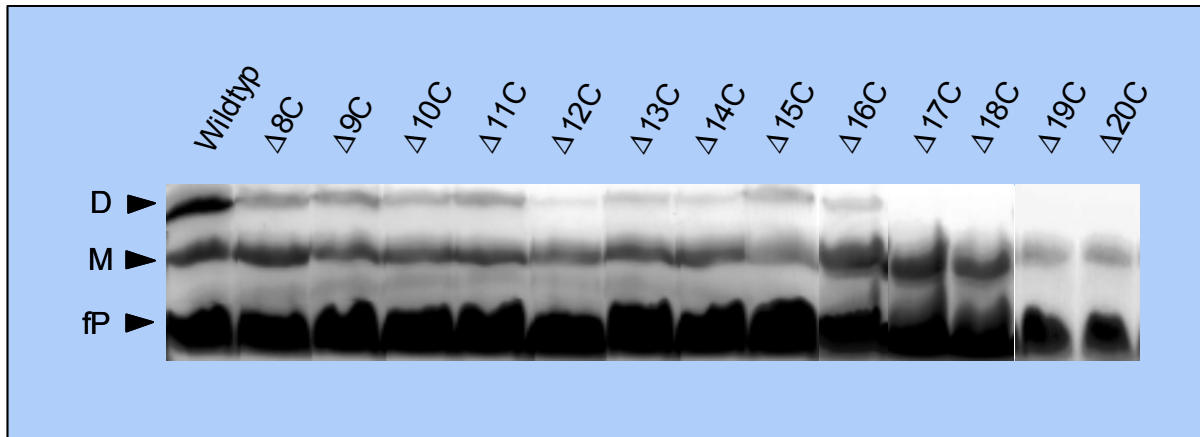


Abb 4.3-2: Auswirkung C-terminaler Deletionen auf die Bildung stabiler dimerer Komplexe des Lhca1 im Standard-Dimerisierungsverfahren (Wildtyp + Deletionsmutante). Die Auftrennung erfolgte elektrophoretisch in einem schwach denaturierenden Gel. D, Dimer; M, Monomer; fP, freies Pigment.

Die Intensität und Dimerisierungsfähigkeit variierten an und um diese Position. Daher wurden die Dimerisierungseffizienzen der letzten drei Deletionsmutanten vor W-185 (Lhca1 Δ 15C, - Δ 14C, - Δ 13C) und der nachfolgenden Mutante (Lhca1 Δ 17C) durch eine Reihe von Gelauftrennungen nach densitometrischer Auswertung der Bandenintensitäten statistisch bestimmt (Tab. 4.3-2; Kap. 3.4.2.1). Wie aus Tabelle 4.3-2 hervorgeht, assemblierte die Mutante Lhca1 Δ 17C in keinem Fall mit dem Lhca4-Wildtyp zu einem Dimer. Obwohl die Intensität der Dimerbande (= Dimerisierungseffizienz) von Lhca1 Δ 16C nur bei 15% lag, wurden in 70% der Rekonstitutionen Dimere gebildet. Da die Effizienzen und Bildungshäufigkeiten der drei längeren Deletionsmutanten zunahmen, kann man das Protein Lhca1 Δ 16C als die entscheidende Mutante am C-Terminus des Lhca1 bezeichnen. Der Verlust des Assemblierungsvermögens mit Entfernung einer weiteren Aminosäure (Lhca1 Δ 17C) war hier, wie auch schon am N-Terminus von Lhca1, die Folge einer Tryptophan-Deletion an Position 185 (Tab. 4.3-1).

Tab. 4.3-2: Auswertung der Dimerbildung C-terminaler Deletionsmutanten von Lhca1 im Vergleich zum Wildtyp. Die Daten wurden durch Auftrennung von Dimer-Rekonstitutionsansätzen in schwach denaturierenden Gelen densitometrisch ermittelt. Die Dimerisierungseffizienz wurde durch einen Vergleich der Bandenintensitäten der Protein-Pigment-Komplexe von Deletionsmutanten mit Wildtyp im Gel ermittelt (Kap. 3.4.2.1). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus der angegebenen Anzahl von Experimenten.

Klon	Dimerisierungshäufigkeit [%]	Anzahl der Experimente	Dimerisierungseffizienz [%]
WT	100	10	100
Δ 13C	100	8	21 \pm 6
Δ 14C	77	9	18 \pm 9
Δ 15C	88	9	25 \pm 17
Δ 16C	70	10	15 \pm 10
Δ 17C	0	6	0

Lhca4. Die letzte N-terminale Mutante des Lhca4, die mit dem Lhca1-Wildtyp noch stabile Dimere bildete, war Lhca4 Δ 38N. Wie aus dem Gelbild (Abb. 4.3-3) ersichtlich, war die Dimerausbeute in Rekonstitutionen mit diesem Protein gegenüber dem Wildtyp schon deutlich reduziert. Die folgende Deletionsmutante, Lhca4 Δ 39N, bei der ein Tryptophan deletiert wurde, war nicht mehr in der Lage zu stabilen Dimeren zu assemblieren (Abb 4.3-3). Wie aus Tabelle 4.3-3 hervorgeht, endet die Fähigkeit des Lhca4 Monomere zu bilden an der gleichen Position wie die Fähigkeit Dimere zu bilden.

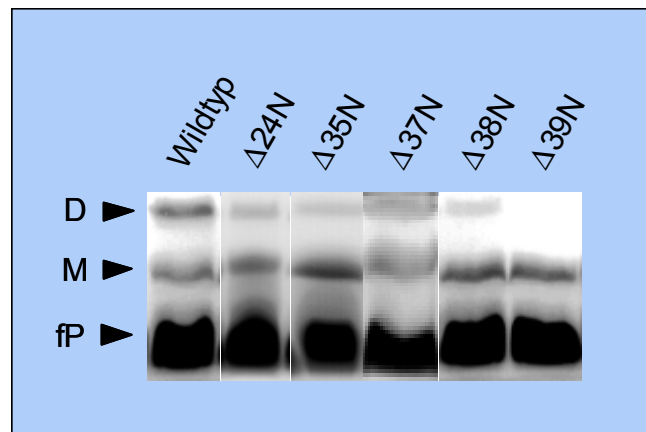


Abb 4.3-3: Auswirkung N-terminaler Deletionen auf die Bildung stabiler dimerer Komplexe des Lhca4 im Standard-Dimerisierungsverfahren (Wildtyp + Deletionsmutante). Die Auftrennung erfolgte elektrophoretisch in einem schwach denaturierenden Gel. D, Dimer; M, Monomer; fP, freies Pigment.

Am C-Terminus des Lhca4 war das letzte monomerbildende Protein Lhca4 Δ 12C. Diese Mutante interagiert mit dem Lhca1-Wildtyp zu einem Dimer. In diesem Fall wurde das Protein schrittweise verkürzt, um das letzte dimerbildende Protein zu identifizieren, das mit der Mutante Lhca4 Δ 33C ermittelt werden konnte (Abb 4.3-4). Der Lhca4 war in diesem Fall schon um zehn Aminosäuren in die dritte Transmembranhelix hinein verkürzt. Die um eine Aminosäure (Isoleucin) längere Mutante Lhca4 Δ 32C lieferte wieder eine Dimerbande nach einer Gelauf trennung. Alle untersuchten Proteine zwischen der Position 169 (Lhca4 Δ 32C) und 189 (Lhca4 Δ 12C) bildeten Dimere, deren Ausbeuten jedoch differierten (Abb. 4.3-4). Das Gelbild der Abbildung 4.3-4 gibt daher nur einen qualitativen Eindruck der Ergebnisse.

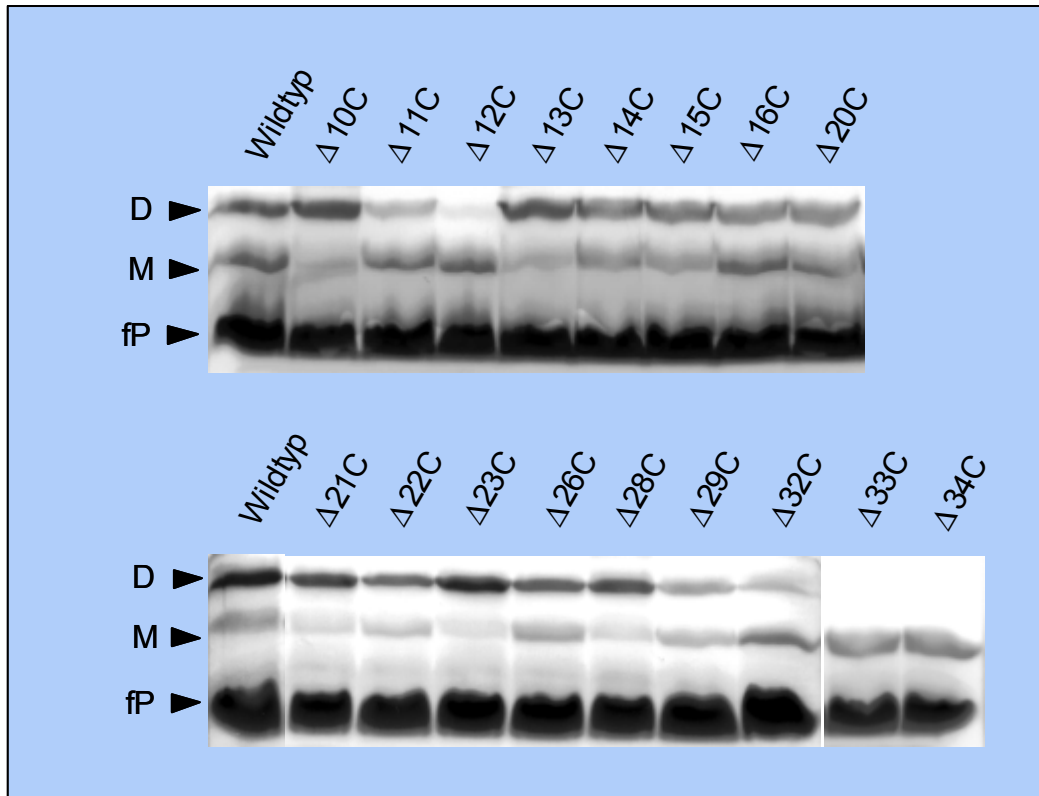


Abb 4.3-4: Auswirkung C-terminaler Deletionen auf die Bildung stabiler dimerer Komplexe des Lhca4 im Standard-Dimerisierungsverfahren (Wildtyp + Deletionsmutante). Die Auftrennung erfolgte elektrophoretisch in einem schwach denaturierenden Gel. D, Dimer; M, Monomer; fP, freies Pigment.

Lhca4 Δ 32C als Minimaldimermutante wurde, wie schon die Mutanten am C-Terminus des Lhca1, über eine statistische Auswertung densitometrisch bestätigt und abgesichert (Kap. 3.4.2.1), da auch hier die Bandenintensität variierte und die Dimerbildung nicht immer möglich war (Tab. 4.3-4).

Tab. 4.3-3: Übersicht der Deletionsmutanten des A) N- und B) C-Terminus des Lhca4 im Hinblick auf ihre Dimerisierungsfähigkeit. Zur Erklärung der verwendeten Markierungen s. Tab. 4.3-1.

A)

Klon	Sequenz		Dimer
Wildtyp	MRGS ¹ KKGQWLPGLASPDYLDGSLSGDNGFDPLGLVEDPE	NLKWFIQA ⁴³ ...	+
Lhca4 Δ 24N	... ¹ KKGQWLPGLASPDYLDGSLSGDNGFDPLGLVEDPE	NLKWFIQA ⁴³ ...	+
Lhca4 Δ 35N	1	NLKWFIQA ⁴³ ...	+
Lhca4 Δ 37N	1	KWFIQA ⁴³ ...	+
Lhca4 Δ 38N	1	W FIQA ⁴³ ...	+
Lhca4 Δ 39N	1	FIQA ⁴³ ...	-

B)

Klon	Sequenz				Dimer
Wildtyp	... ¹⁶⁰ AMLAF ¹⁶⁰ LGFI ¹⁶⁰ VQHNV ¹⁶⁰ TGKG	PF	DNLLQHLSDP	WHNTIIQ ²⁰⁰ TLSN ²⁰⁰	+
Lhca4Δ10C	... ¹⁶⁰ AMLAF ¹⁶⁰ LGFI ¹⁶⁰ VQHNV ¹⁶⁰ TGKG	PF	DNLLQHLSDP	W ²⁰⁰	+
Lhca4Δ11C	... ¹⁶⁰ AMLAF ¹⁶⁰ LGFI ¹⁶⁰ VQHNV ¹⁶⁰ TGKG	PF	DNLLQHLSDP	²⁰⁰	+
Lhca4Δ12C	... ¹⁶⁰ AMLAF ¹⁶⁰ LGFI ¹⁶⁰ VQHNV ¹⁶⁰ TGKG	PF	DNLLQHLSD	²⁰⁰	+
Lhca4Δ13C	... ¹⁶⁰ AMLAF ¹⁶⁰ LGFI ¹⁶⁰ VQHNV ¹⁶⁰ TGKG	PF	DNLLQHLS	²⁰⁰	+
Lhca4Δ14C	... ¹⁶⁰ AMLAF ¹⁶⁰ LGFI ¹⁶⁰ VQHNV ¹⁶⁰ TGKG	PF	DNLLQHL	²⁰⁰	+
Lhca4Δ15C	... ¹⁶⁰ AMLAF ¹⁶⁰ LGFI ¹⁶⁰ VQHNV ¹⁶⁰ TGKG	PF	DNLLQH	²⁰⁰	+
Lhca4Δ16C	... ¹⁶⁰ AMLAF ¹⁶⁰ LGFI ¹⁶⁰ VQHNV ¹⁶⁰ TGKG	PF	DNLLQ	²⁰⁰	+
Lhca4Δ20C	... ¹⁶⁰ AMLAF ¹⁶⁰ LGFI ¹⁶⁰ VQHNV ¹⁶⁰ TGKG	PF	D	²⁰⁰	+
Lhca4Δ21C	... ¹⁶⁰ AMLAF ¹⁶⁰ LGFI ¹⁶⁰ VQHNV ¹⁶⁰ TGKG	PF		²⁰⁰	+
Lhca4Δ22C	... ¹⁶⁰ AMLAF ¹⁶⁰ LGFI ¹⁶⁰ VQHNV ¹⁶⁰ TGKG	P		²⁰⁰	+
Lhca4Δ23C	... ¹⁶⁰ AMLAF ¹⁶⁰ LGFI ¹⁶⁰ VQHNV ¹⁶⁰ TGKG			²⁰⁰	+
Lhca4Δ26C	... ¹⁶⁰ AMLAF ¹⁶⁰ LGFI ¹⁶⁰ VQHNV ¹⁶⁰ T			²⁰⁰	+
Lhca4Δ28C	... ¹⁶⁰ AMLAF ¹⁶⁰ LGFI ¹⁶⁰ VQHN			²⁰⁰	+
Lhca4Δ29C	... ¹⁶⁰ AMLAF ¹⁶⁰ LGFI ¹⁶⁰ VQH			²⁰⁰	+
Lhca4Δ32C	... ¹⁶⁰ AMLAF ¹⁶⁰ LGFI ¹⁶⁰ VQH			²⁰⁰	+
Lhca4Δ33C	... ¹⁶⁰ AMLAF ¹⁶⁰ LGFI			²⁰⁰	-
Lhca4Δ34C	... ¹⁶⁰ AMLAF ¹⁶⁰ LG			²⁰⁰	-

Die Dimerisierungseffizienz des Lhca4Δ32C lag bei 34% bei einer Dimerisierungshäufigkeit von 71%. In diese Untersuchungen mit einbezogen wurden die Mutanten Lhca4Δ29C, -Δ28C und -Δ26C, die zur Identifizierung der Minimaldimermutante hergestellt worden sind. Diese dimerisierten in allen Versuchen und wiesen Effizienzen zwischen 75% und 64% auf. Da das Protein Lhca4Δ33C bei keinem Experiment Dimere bilden konnte, ist Lhca4Δ32C als die entscheidende Deletionsmutante für den C-Terminus des Lhca4 anzusehen. Durch die starken Schwankungen in der Dimerisierungseffizienz traten hohe Standardabweichungen auf. Die Aussage der Daten ist dadurch aber nicht beeinträchtigt.

Tab. 4.3-4: Statistische Auswertung zur Dimerbildung am C-Terminus des Lhca4. Zur Ermittlung der Dimerisierungsfähigkeit wurden durch Wiederholungen von Dimer-Rekonstitutionsauftrennungen im schwach denaturierenden Gel Häufigkeiten und Effizienzen berechnet (Kap. 3.4.2.1). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus der Gesamtheit aller Experimente. Die Standardabweichung resultiert aus dem selben Datensatz.

Klon	Dimerisierungshäufigkeit [%]	Anzahl der Experimente	Dimerisierungseffizienz [%]
WT	100	14	100
Δ26C	100	4	64 ± 24
Δ28C	100	5	75 ± 25
Δ29C	100	7	68 ± 29
Δ32C	71	14	34 ± 23
Δ33C	0	9	0

4.3.2 Einfluß von Aminosäureaustauschen auf die Dimerbildung

Die Entfernung von Aminosäuren an beiden Termini lieferte Informationen über die minimale Länge der beiden Untereinheiten, die die Formierung stabiler Dimere erlaubt. Ob die Assemblierung durch die im deletierten Peptidstrang enthaltenen Aminosäuren vermittelt wird oder die letzte Aminosäure im dimerbildenden Protein eine starke, für die Bildung eines stabilen Dimers entscheidende Wechselwirkung ausbildet, kann durch den Austausch dieser kritischen Aminosäure im Vollängenprotein geklärt werden.

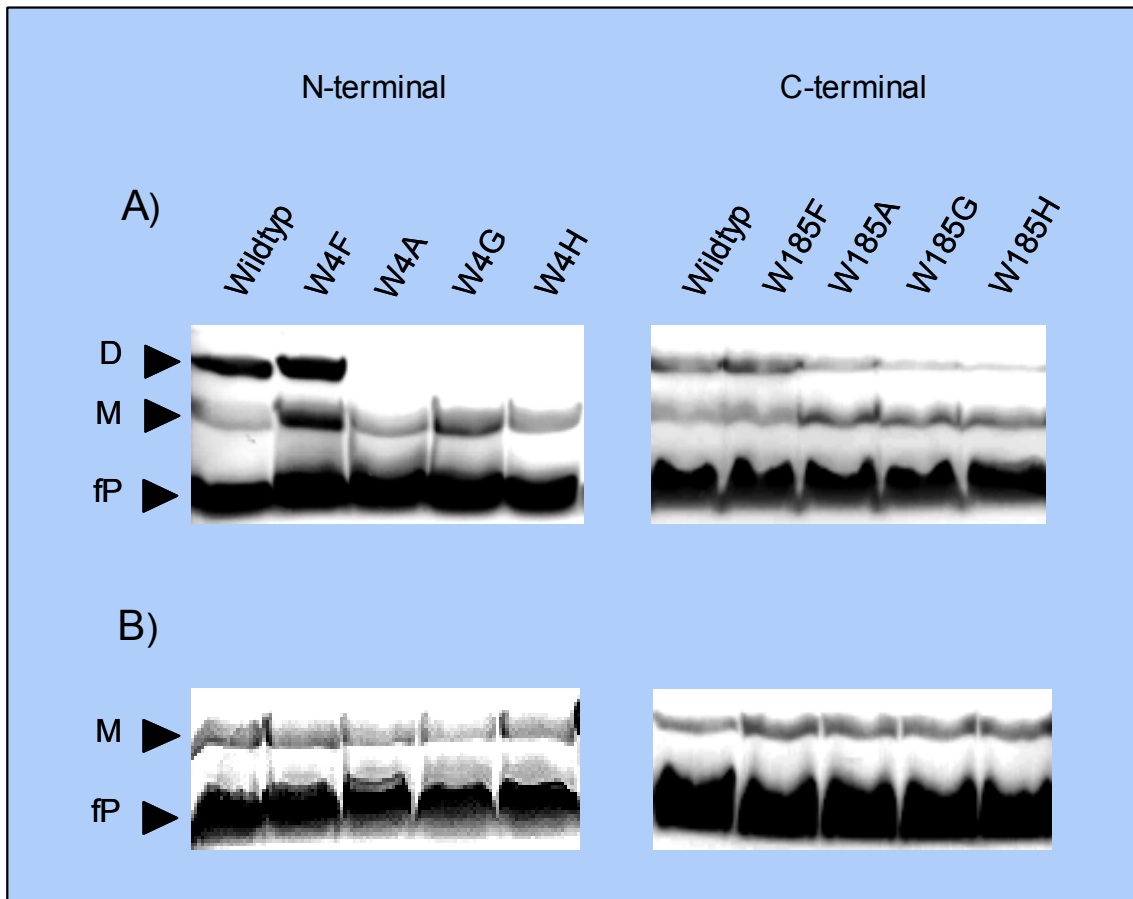


Abb. 4.3-5: Effekt von Aminosäureaustauschen an den kritischen Positionen am N- und C-terminalen Ende des **Lhca1** auf die Bildung stabiler A) Dimere und B) Monomere. Für die Dimerisierungsversuche wurden die dargestellten Lhca1-Mutanten jeweils mit dem Wildtyp von Lhca4 rekonstituiert und in einem schwach denaturierenden Gel aufgetrennt. D, Dimer; M, Monomer; fP, freies Pigment.

4.3.2.1 Einfluß von Punktmutationen in den Termini des Lhca1 auf die Dimerbildung

N-Terminus. Der Austausch des N-proximalen Tryptophans an Position vier des Apoproteins gegen Phenylalanin (Lhca1W4F), Alanin (Lhca1W4A), Glycin (Lhca1W4G) und Histidin (Lhca1W4H; Engelman et al., 1986), zeigte, daß der Einbau von Phenylalanin keine oder nur sehr geringe Auswirkungen auf die Ausbildung stabiler Dimere hat (Abb. 4.3-5A, links). Die Insertion von Alanin, Glycin und Histidin als Alternativen zu Tryptophan verhinderte die Assemblierung der Untereinheiten. Untersuchungen zur Stabilität der

monomeren Lhca1 Punktmutanten konnten nachweisen, daß alle Klone stabile monomere Komplexe bildeten (Abb. 4.3-5B, links), das bedeutet, daß eine ausbleibende Assemblierung nicht die Folge einer instabilen Untereinheit sein kann.

C-Terminus. Am Carboxy-Ende des Lhca1 hatte der Wechsel gegen die oben genannten Aminosäuren keinen ausgeprägten Effekt auf die Bildung der monomeren Untereinheiten, deren Monomer-Bildungseffizienz bei allen Proteinen gleich oder zumindest sehr ähnlich war (Abb. 4.3-5B, rechts). Die Dimerisierung wurde durch die Aminosäuresubstitutionen unterschiedlich beeinflusst. Den stärksten Effekt auf die Dimerausbeute hatte der Austausch gegen Histidin und Glycin (Lhca1W185H und W185G), die beide nur noch geringe Dimer-Bandenintensitäten zeigten. Kaum beeinträchtigt war die Dimerbildung von einem Austausch von Tryptophan zu Phenylalanin. Ersetzte man Tryptophan durch Alanin war die Dimerisierungseffizienz im Vergleich zum Wildtyp leicht reduziert (Abb. 4.3-5A, rechts). Das Ergebnis unterstreicht die Bedeutung des hydrophoben Charakters, aber auch der aromatischen Struktur der Aminosäure, die an dieser Position die Dimerisierung vermittelt.

4.3.2.2 Einfluß von Punktmutationen in den Termini des Lhca4 auf die Dimerbildung

N-Terminus. Das W-39 am N-Terminus des Lhca4 wurde ebenfalls durch Phenylalanin, Alanin, Glycin und Histidin ersetzt. Wie das Gelbild deutlich macht (Abb. 4.3-6A, links), hatte keiner der Austausche einen Einfluß auf die Assemblierung mit dem Wildtyp des Lhca1 zum Dimer. Rekonstitutionen der monomeren Apoproteine zeigten hingegen, daß die Faltung zum stabilen monomeren Komplex durch die eingefügten Aminosäuren Alanin (Lhca4W39A) und Glycin (-W39G) verhindert wurde (Abb. 4.3-6B). Der Einbau von Phenylalanin und Histidin zeigte nur einen geringen Effekt auf die Monomerfaltung. Die Dimerisierung blieb unbeeinflusst von den Eigenschaften der monomeren Untereinheiten, wie das Gelbild (Abb. 4.3-6A, links) beweist.

C-Terminus. Da es sich im Fall der kritischen Aminosäure (I-168), die sich aus den Untersuchungen der Deletionsmutanten des Lhca4 am C-Terminus ergab, nicht um Tryptophan sondern Isoleucin handelte, wurde diese gegen Alanin, Phenylalanin, Histidin, Leucin und Tryptophan ausgetauscht. Wie schon am Amino-Ende, waren auch hier alle Klone fähig, mit dem Lhca1-Wildtyp zu stabilen dimeren Komplexen zu assemblieren (Abb. 4.3-6A, rechts). Während der Austausch des Isoleucins gegen andersartige Aminosäuren (Alanin, Phenylalanin, Histidin, Tryptophan) eine Reduzierung der Dimerisierungseffizienz nach sich zog, war die Dimerausbeute der Leucin-Mutante (Lhca4I168L) dem Isoleucin-Wildtyp gleich. Daß die Austausche keinen Einfluß auf die Stabilität der Monomere ausübten, macht Abb. 4.3-6B (rechts) deutlich.

4.3.2.3 Einfluß von Aminosäureaustauschen in den Transmembranhelices auf die Dimerbildung

Im Rahmen zweier Diplomarbeiten wurden Aminosäureaustausche an potentiellen chlorophyllbindenden Resten in den (Transmembran-) Helices des Lhca4 durchgeführt und hinsichtlich ihrer Bedeutung für die langwellige Fluoreszenz des monomeren Komplexes untersucht (Lago-Places, 2000; Thomé, 2000). Ihr Einfluß auf die Dimerbildung wurde im Rahmen dieser Arbeit getestet.

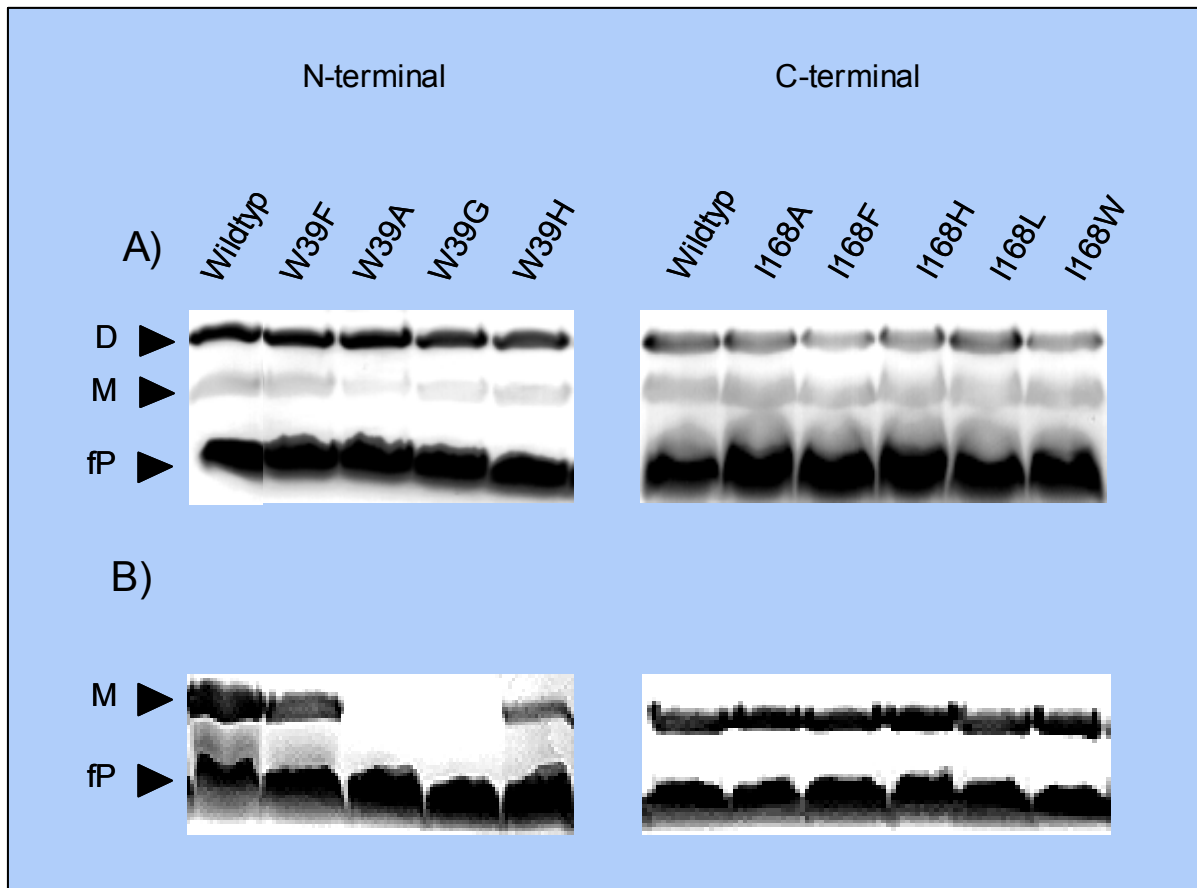


Abb. 4.3-6: Effekt von Aminosäuresubstitutionen auf die Bildung von A) Dimeren und B) Monomeren, der kritischen Aminosäuren am N- und C-terminalen Ende von **Lhca4**. Für die Dimerisierungsversuche wurden die dargestellten Lhca4-Klone jeweils mit dem Wildtyp von Lhca1 rekonstituiert und in einem schwach denaturierenden Gel aufgetrennt. D, Dimer; M, Monomer; fP, freies Pigment.

Austausche von Glutamat gegen Serin an den Positionen 44 (Helix1) und 102 (Helix 2) sowie Glutamat gegen Glycin (G) an Position 153 (Helix 3) verhinderten die Bildung eines dimeren LHCs (Abb. 4.3-7A). An Position 94 hat die Substitution von Glutamat durch Serin keinen Einfluß auf die Assemblierung der Untereinheiten. Ersetzte man Asparagin durch Serin an Position 156, blieb die Fähigkeit Dimere zu bilden erhalten. Dagegen war keine Dimerbildung bei einem Austausch von Glutamin gegen Glycin an Position 170 mehr möglich (Abb. 4.3-7A). Bei Substitution von Glutamat durch Leucin an den Positionen 44, 47, 102 und 153 assemblierten die Untereinheiten zu keinem stabilen dimeren Komplex. Nur die Mutante Lhca4H185L, nach dem Modell von Green und Pichersky (1994) in der vierten amphipathischen Helix liegend, zeigte eine schwache Dimerbande im Gel (Abb. 4.3-7B).

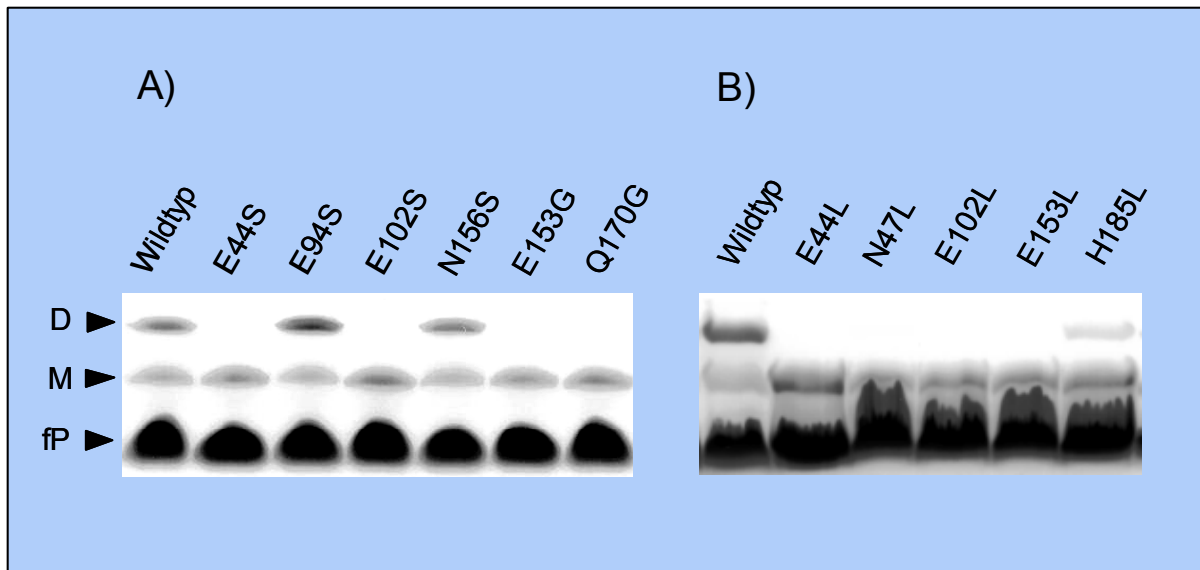


Abb. 4.3-7: Effekt von Aminosäureaustauschen in den Transmembranhelices des Lhca4 auf die Dimerisierungsfähigkeit der monomeren Untereinheiten (Mutanten freundlicherweise von A) E. Lago-Places und B) P. Thomé zur Verfügung gestellt). Die genannten überexprimierten Lhca4-Proteine wurden jeweils mit dem Wildtyp-Protein von Lhca1 rekonstituiert und in einem schwach denaturierenden Gel aufgetrennt. D, Dimer; M, Monomer; fP, freies Pigment.

4.3.3 Biophysikalische Charakterisierung der dimeren Komplexe

Neben der Identifizierung der für die Dimerisierung wichtigen Aminosäuren im N- und C-terminalen Bereich der beiden Untereinheiten, ist es von Interesse, durch Vergleiche mit den Wildtypen, Veränderungen der Chl *a/b*-Verhältnisse, der 77 K Fluoreszenzemission oder der CD-Absorption als Folge der Proteinmodifikation aufzuklären.

4.3.3.1 Fluoreszenzemissionsspektroskopie

Deletionsmutanten

Das Emissionsspektrum der letzten noch zur Dimerbildung fähigen N-terminalen Deletionsmutante von Lhca1, Lhca1 Δ 3N, ist nahezu identisch mit dem des Wildtyps nach selektiver Anregung von Chl *b* im LHC (Abb. 4.3-8A). Die Verkürzung des C-Terminus um 16 Aminosäuren (Lhca1 Δ 16C) hatte zur Folge, daß das Hauptmaximum (732 nm) um 3 nm in den kürzerwelligen Bereich verschoben wurde und das Nebenmaximum bei 686 nm viel deutlicher ausgeprägt war als beim Wildtyp.

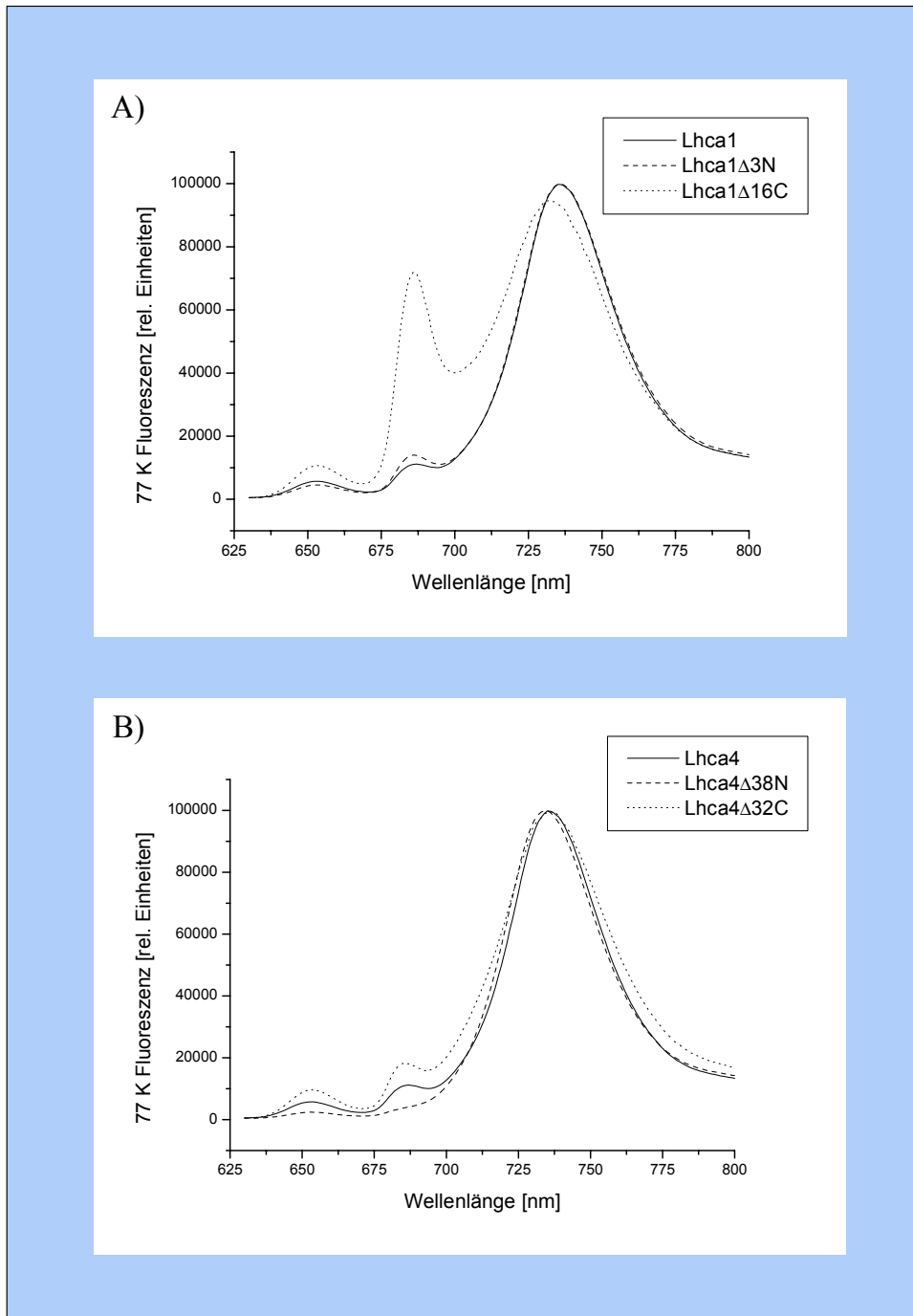


Abb. 4.3-8: Einfluß N- und C-terminaler Deletionen im A) Lhca1 und B) Lhca4 auf das Fluoreszenzemissionsverhalten der rekonstituierten dimeren Komplexe bei 77 K. Dargestellt sind die Mutanten, die noch stabile dimere Komplexe nach der Auftrennung im schwach denaturierenden Gel zeigen. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 470 nm. Die Spektren sind auf gleiche Fluoreszenzemissionsmaxima normiert und stellen Mittelwerte aus mindestens drei Messungen dar.

Am N-Terminus des Lhca4 (Lhca4 Δ 38N) führte die Verkürzung um 38 Aminosäuren zu keiner Verschiebung im Hauptmaximum bei 735 nm, während sich das Nebenmaximum von 682 nm auf 676 nm verschob (Abb. 4.3-8B). Die C-terminale Deletionsmutante Δ 32C des Lhca4 war bis auf ein stärker ausgeprägtes Nebenmaximum bei 682 nm identisch mit dem

Wildtyp. Das F_{735}/F_{682} -Verhältnis, d.h. die Gegenüberstellung der Fluoreszenzintensitäten bei diesen Wellenlängen, beträgt hier 3.74 im Vergleich mit 6.85 beim Wildtyp.

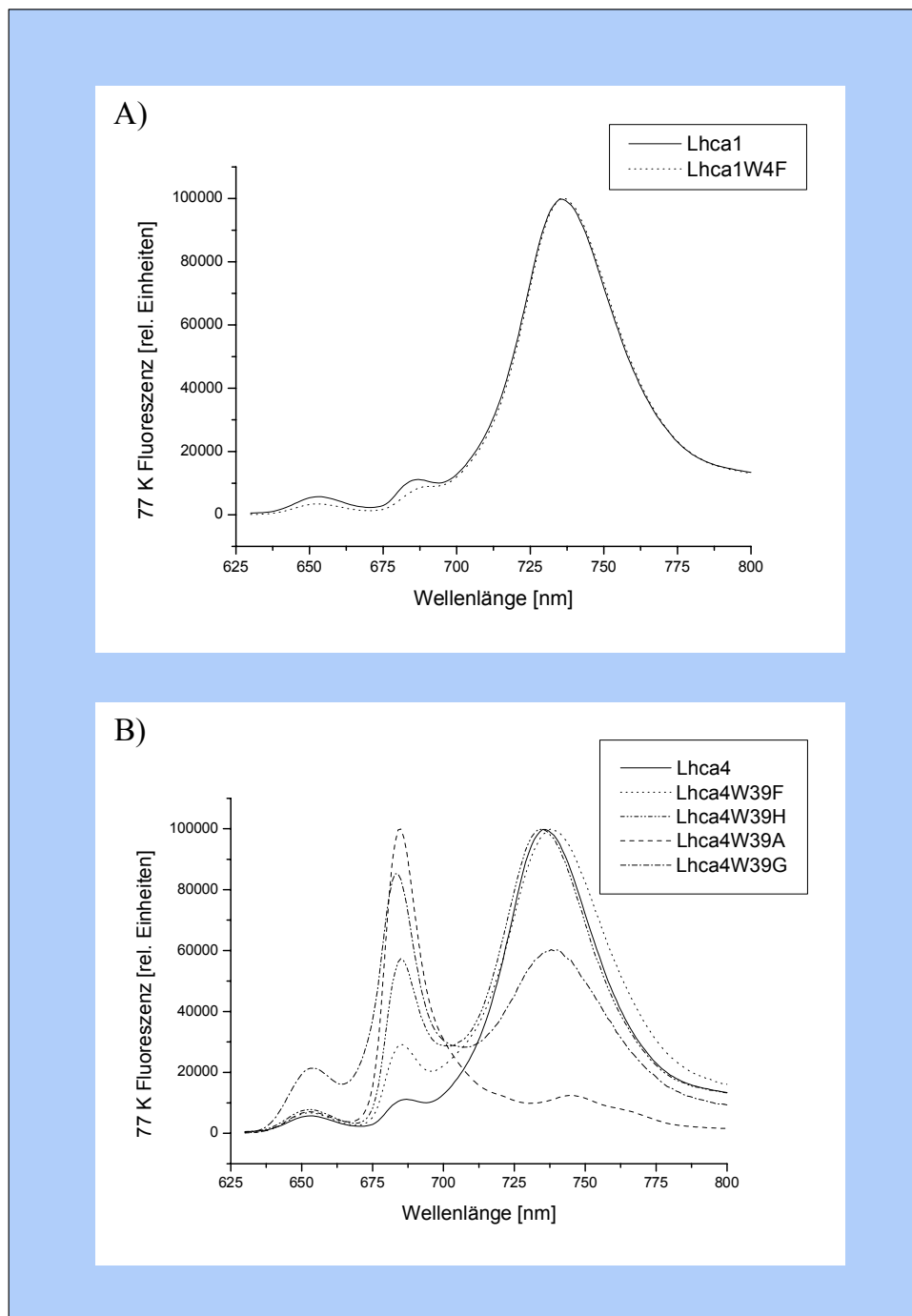


Abb. 4.3-9: Bedeutung der N-terminalen Aminosäureaustausche von A) Lhca1 und B) Lhca4 für das Fluoreszenzemissionsverhalten der hergestellten Dimere. Dargestellt sind die Punktmutanten, die in gering denaturierenden Gelen stabile dimere LHCs bilden. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 470 nm. Die Spektren sind auf gleiche Fluoreszenzemissionsmaxima normiert und stellen Mittelwerte aus mindestens drei Messungen dar.

Punktmutanten

Der Austausch von Tryptophan gegen Phenylalanin am N-terminalen Ende des Lhca1 (Lhca1W4F) – der einzigen dimerbildenden Mutante – führte zu einer nur geringfügigen Veränderung des Spektrums gegenüber dem des Wildtyp-Dimers (Abb. 4.3-9A).

Am N-Terminus des Lhca4 führte der Austausch von Tryptophan gegen Phenylalanin zu einer geringen Veränderung (Lhca4W39F) der Emission. Abnehmende Hydrophobizität und und/oder sterische Unterschiede der bei Lhca4 eingefügten Aminosäuren führten zur Verringerung der Fluoreszenz bei ~ 735 nm (Abb. 4.3-9B). Damit einhergehend stieg die Fluoreszenz bei ~ 685 nm deutlich an. So war das Spektrum von Lhca4W39F dem des Wildtyps sehr ähnlich, das Hauptmaximum verschob sich um 1-2 nm in den längerwelligen Bereich und das Nebenmaximum bei 685 nm war deutlicher ausgeprägt. Der Wechsel gegen Histidin erhöht das Nebenmaximum bei 685 nm weiter bis auf etwa 50% des Hauptmaximums und verursacht eine Verschiebung des Hauptmaximums um 1 nm in den blauen Bereich des Spektrums. Ein Glycin an dieser Position führte zu einer deutlichen Reduzierung der langwelligen Fluoreszenz bei gleichzeitiger Erhöhung des Nebenmaximums bei 683 nm. Beim Austausch gegen Alanin war kaum noch ein langwelliges Maximum detektierbar (Abb. 4.3-9B). Die C-terminalen Punktmutanten von Lhca1 und Lhca4 zeigten dagegen keine Unterschiede zum Wildtyp (Daten nicht gezeigt).

4.3.3.2 CD-Spektroskopie

Von den dimeren Deletionsmutanten Lhca1 Δ 3N, Lhca1 Δ 16C, Lhca4 Δ 38N und Lhca4 Δ 32C wurde das CD-Signal im sichtbaren Wellenlängenbereich zur Detektion von Veränderungen in der Chlorophyllbindung erfaßt.

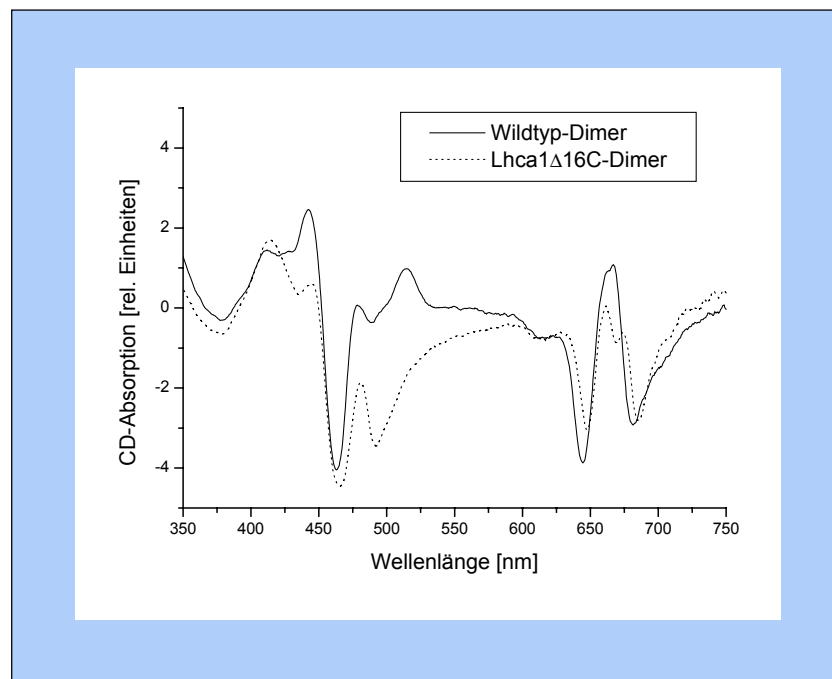


Abb. 4.3-10: Auswirkung der C-terminalen Deletion von 16 Aminosäuren am Lhca1 (Lhca1 Δ 16C) auf das CD-Signal im sichtbaren Wellenlängenbereich. Dargestellt ist der Vergleich mit Wildtyp-Dimer und dem monomeren Lhca4-Wildtyp.

Das Spektrum des Lhca1 Δ 16C zeigte deutliche Unterschiede zum Wildtyp. Die Deletion von 16 Aminosäuren am C-Terminus des Lhca1 hatte zur Folge, daß, obwohl stabile Komplexe gebildet werden, das CD-Signal nicht mehr dem des dimeren Komplexes entspricht, sondern dem des Lhca4 Monomers. Beide Spektren haben ein Maximum bei 414 nm und Minima bei 472, 491 und 650 nm. Demgegenüber stehen Maxima von 443 und 515 nm beim Wildtyp-Dimer, die keine Entsprechungen bei den beiden anderen haben (Abb. 4.3-10).

Die CD-Spektren der drei Dimerminimalmutanten wichen nicht von den Spektren des Wildtyps ab (Daten nicht gezeigt).

4.3.4 Biochemische Charakterisierung

Die vier letzten noch Dimere bildenden Deletionsmutanten sind hinsichtlich ihrer Chl *a/b*-Verhältnisse charakterisiert worden. Von den zwei C-terminalen Mutanten Lhca1 Δ 16C und Lhca4 Δ 32C wurde zusätzlich die Proteinmenge in den Komplexen quantifiziert, womit deren Protein/Chlorophyll-Stöchiometrie bestimmt werden konnte.

4.3.4.1 Einfluß der Modifikationen auf die Chl *a/b* Verhältnisse

Die Menge der von den Komplexen gebundenen Chlorophylle wurde nach Porra et al. (1989) in 80% Aceton ermittelt. Das dafür eingesetzte Material entstammte Auftrennungen im Saccharosedichtegradienten.

Die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Werte lagen bei 2.49. Die Ergebnisse der Deletionsmutanten variierten in kleinem Maße um diesen Wert und zeigten keine signifikanten Abweichungen im Verhältnis der beiden Chlorophyllspezies zueinander (Tab. 4.3-5).

Tabelle 4.3-5: Chl *a/b*-Verhältnisse von Wildtyp und Deletionsmutanten von Lhca1 und Lhca4. Der angegebene Mittelwert und die Standardabweichung errechnen sich aus mindestens drei Messungen.

Wildtyp	Lhca1		Lhca4	
	Δ 3N	Δ 16C	Δ 38N	Δ 32C
2.49 \pm 0.15	2.57 \pm 0.16	2.39 \pm 0.07	2.43 \pm 0.14	2.30 \pm 0.10

4.3.4.2 Einfluß der Deletionen auf die Protein/Chlorophyll-Stöchiometrie

Die mittels BCA-Assay (Kap. 3.4.3.2) quantifizierten Proteinmengen konnten mit den bekannten Chlorophyllmengen in den dimeren LHCs in Relation gesetzt werden und somit die Protein/Chlorophyll-Stöchiometrien für die beiden C-terminalen Deletionsmutanten mit dem Wildtyp verglichen werden.

Dabei ergaben sich deutliche Abweichungen in den Verhältnissen beider Deletionsmutanten zum Wildtyp-LHC. Sowohl die Menge an Chl *a* als auch Chl *b* ist jeweils um etwa die Hälfte reduziert (Tab. 4.3-6). Berücksichtigt man die Chlorophyllmengen und deren Verhältnis zueinander in den monomeren Untereinheiten (Kap. 4.2.3), deutet es darauf hin, daß beide modifizierten Untereinheiten in den dimeren LHCs (fast) keine Chlorophylle mehr binden.

Tabelle 4.3-6: Chlorophyll/Protein-Stöchiometrie von dimerem Wildtyp und den C-terminalen Deletionsmutanten von Lhca1 und Lhca4. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus fünf bis sechs Messungen berechnet.

Klon	Chlorophyll <i>a</i> + <i>b</i>	Chlorophyll <i>a</i>	Chlorophyll <i>b</i>
Wildtyp	10.86 ± 2.56	7.82 ± 1.88	3.04 ± 0.68
Lhca1Δ16C	5.43 ± 1.25	3.84 ± 0,89	1.59 ± 0.36
Lhca4Δ32C	5.13 ± 2.11	3.60 ± 1,50	1.53 ± 0.61

5 Diskussion

Die Aufklärung von Proteinstrukturen, die Bestimmung von funktionellen Regionen und von Interaktionspartnern bei Assemblierungen helfen, ein Verständnis für die komplexen Zusammenhänge zu entwickeln wie aus einer gegebenen Primärstruktur und den Umgebungsfaktoren ein funktionelles Protein gebildet wird.

Die Röntgen- oder die elektronenmikroskopische Strukturanalyse liefert hervorragende Informationen zur Raumstruktur eines Proteins. Grundlage für diese Untersuchung ist die Herstellung von Proteinkristallen, deren Synthese gerade bei Membranproteinen sehr große Probleme bereitet, da die nötigen Detergenzien, die für die Faltung der Membranproteine unerlässlich sind, die Kristallbildung stören können. Aber selbst eine gute Strukturauflösung reicht nicht zur Klärung aller Fragestellungen aus. Ist sie doch eine Momentaufnahme eines Protein-Komplexes in einem unbeweglichen Kristallgitter. So ist man auf molekulargenetische und biochemische Methoden angewiesen, um Aspekte wie den Mechanismus von Substratkatalyse oder die Bindung von Cofaktoren zu erforschen. Dabei verwendet man z.B. gezielt modifizierte Proteine oder Cofaktoren und charakterisiert deren Verhalten in *in vitro* Systemen, um sie mit dem Wildtyp vergleichen zu können.

Das bereits vorgestellte Untersuchungsobjekt (Kap. 1.3.1), der LHCI-730 aus Tomate, ist ein heterodimerer Pigment-Protein-Komplex. Er ist zusammen mit dem LHCI-680A und LHCI-680B Bestandteil des Lichtsammelapparates des PSI und ein Mitglied der *cab*-Familie. Trotz der großen Sequenzhomologien, gerade in den strukturbildenden Regionen, unterscheiden sich die Pigment-Protein-Komplexe der *cab*-Familie in ihrer Organisationsform und, speziell der LHCI-730, in der langwelligen 77 K Fluoreszenzemission. Es ist von großem Interesse, die Regionen in den Untereinheiten des LHCI-730 zu identifizieren, die für deren Dimer-Assemblierung verantwortlich sind und herauszufinden, was diese von Bereichen der anderen *cab*-Proteine unterscheidet.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Bereiche oder einzelne Aminosäuren identifiziert werden, die durch Wechselwirkung die Assemblierung der beiden monomeren Komplexe bewirken und stabilisieren. Diese Untersuchungen beinhalteten die Bestimmung von Proteinregionen, die für die Bildung stabiler monomerer LHCs notwendig sind. Die Faltung von stabilen monomeren Untereinheiten wurde zu Beginn der Arbeit als eine Vorbedingung für ihre Dimerisierung angesehen. Die monomeren Lhca1 und Lhca4 treten in der Biosynthese des LHCI-730 als Zwischenformen, vielleicht sogar als funktionelle Einheiten auf (Dreyfuss und Thornber, 1994). Außerdem bieten die Daten über die Stabilität der monomeren Untereinheiten wichtige Interpretationshilfen zum Verständnis der Resultate zur Dimerbildung.

Die Untersuchungen wurden mit rekombinanten Proteinen durchgeführt, die in *E. coli* überexprimiert wurden. Diese konnten mittels eines speziellen Protokolls zur Rückfaltung des Apoproteins mit Gesamtpigmentextrakt (= Rekonstitution) zu einem Pigment-Protein-Komplex gefaltet werden, der mit dem nativen LHC nahezu identische spektroskopische Eigenschaften aufweist (Schmid et al., 1997). Durch N- und C-terminale Deletionen sowie Aminosäureaustausche, die allesamt durch PCR-Mutagenese auf DNA-Ebene durchgeführt wurden, ist das Apoprotein gezielt verändert worden. Die hergestellten Mutanten wurden rekonstituiert und im schwach denaturierenden Gelsystem auf die Bildungsfähigkeit stabiler monomeres bzw. dimerer LHCs untersucht.

5.1 Bedeutung von Tryptophan für die Bildung stabiler Protein-Komplexe

Die Untersuchungen an Deletionsmutanten von Lhca1 und Lhca4 zeigen in vielen Fällen, daß Tryptophan sowohl für die Monomerbildung/-stabilität als auch für die Dimerisierung der LHCs eine wichtige Rolle spielt. Die proteinstabilisierende Bedeutung des Tryptophans beschränkt sich aber nicht nur auf die LHC-Proteine, sondern tritt auch bei einem Großteil der Membranproteine auf. Das Vorkommen von Tryptophan in Membranproteinen ist im Vergleich zu löslichen Proteinen sehr hoch. Die Lokalisierung von Tryptophan an den Grenzbereichen von Membranproteinen ist durchaus konserviert (Schiffer et al., 1992; Landolt-Marticorena et al., 1993) und läßt sich auch an den Lhca- und Lhcb-Proteinen nachvollziehen (Green und Pichersky, 1994). Allgemein wird dem Tryptophan eine Funktion als „Anker“ zugesprochen (Schiffer et al., 1992). Die Seitenketteneigenschaften dieser Aminosäure ermöglichen dem Protein eine feste Positionierung in den Membranübergangsbereichen durch Einbettung des hydrophoben Ringes in den apolaren Lipidbestandteil sowie durch Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Stickstoffatom des Indolringes mit den Kopfgruppen des Lipids. Eine Wechselwirkung über Wasserstoffbrücken ist nicht auf Gruppen im Lipid festgelegt. Sie kann auch mit dem Carbonyl-Sauerstoff anderer Proteinsegmente stattfinden, was die Möglichkeit von intra- und interspezifischen Proteininteraktionen eröffnet (Schiffer et al., 1992; Yau et al., 1998). In einem umfangreichen Homologievergleich von bakteriellen Proteinen fand Heijne (1986) im Durchschnitt einen Anteil von 3.3% Tryptophan an der Gesamtaminosäuremenge der untersuchten Membranproteine. Im Vergleich dazu besitzen lösliche Proteine nur einen Anteil von 1.2% Tryptophan. Die L- und M-Untereinheit des Reaktionszentrums photosynthetischer Bakterien ist mit durchschnittlich 5.8% Tryptophan besetzt. Dabei entfielen 5.2% auf die Transmembranhelices und 6.4% auf die Übergangsbereiche von den Helices zu den Schleifenregionen (Schiffer et al., 1992). Im LHCI-730 sind im Durchschnitt 3% aller Aminosäuren Tryptophane. Das entspricht 6 Tryptophanen in jeder Untereinheit. Die Lokalisierung der Tryptophane ist an vier Positionen von Lhca1 und Lhca4 konserviert. Die Transmembranhelices 1 und 2 jeder Untereinheit besitzen an der Übergangsregion der Helix 1 zu Helix 2 ein Tryptophan, außerdem liegt jeweils am Ende der amphipathischen Helix diese Aminosäure.

Aktuelle Untersuchungen konnten zeigen, daß Tryptophan eine Aminosäure ist, die als sogenanntes *hydrophobic mismatch* eine wesentliche Rolle bei der Lipid-Protein-Wechselwirkung spielt und dies mit dem häufigen Vorkommen von Tryptophan an den Flanken von Transmembranhelices in engem Zusammenhang steht (de Planque et al., 2002).

Bedeutung von Tryptophan für die Assemblierung von Untereinheiten

Obwohl in drei von vier Fällen die Aminosäure Tryptophan die kritische Position der letzten dimerbildenden Mutanten besetzte, war die Funktion für die LHC-Stabilisierung durchweg unterschiedlich. Es ist auffällig, daß die Tryptophane im Protein offensichtlich inkomparable Positionen einnehmen. Das Protein stellt unterschiedliche Anforderungen an die Eigenschaften der Aminosäure, um die nötige Funktion zu erfüllen.

Die Bedeutung von Tryptophan für die Stabilität der PSII-assoziierten Lichtsammelkomplexe höherer Pflanzen wurde bisher bei Untersuchungen zur Monomerstabilität am C-Terminus des Lhcb1 (Paulsen und Kuttkat, 1993) und im Zusammenhang mit der Trimerisierung von Lhcb1 am N- (Hobe et al., 1995) und C-Terminus (Kuttkat et al., 1996) gezeigt. Tryptophan ist nicht nur für die Assemblierung pflanzlicher Lichtsammelkomplexe essentiell. Als Folge des Aminosäureaustausches W-137 am Ende der Helix in bR kommt es zum Zerfall des Kristallgitters (s. Fußnote 2, Kap. 1; Krebs und Isenbarger, 2000). In zwei weiteren

Veröffentlichungen fanden die Autoren Tryptophan fast immer in den *hot spots* von Protein-Protein-Interaktionen (Bogan und Thorn, 1998; Sengchanthalangsy et al., 1999). In Untersuchungen des Lichtsammelkomplexes des photosynthetisierenden Bakteriums *Rb. capsulatus* fand man wiederum Tryptophan involviert. Die Substitution von W-8 im LH1 α -Protein durch Alanin führte trotz ähnlicher Hydrophobizität der verwendeten Aminosäure dazu, daß kein LH1 gebildet werden konnte (Richter et al., 1991). Ersetzte man den Tryptophan-Rest durch Seitenketten, die in ihrer Hydrophobizität und Struktur ähnlich sind (Phenylalanin, Tyrosin), so hatte das kaum einen Effekt auf die LH-Bildung. Die Verwendung von Histidin an gleicher Position hatte nur eine leichte Reduktion an Insertionen stabiler LH1-Proteine in die Membran zur Folge. Die Autoren schlossen, daß die aromatische Struktur des Tryptophans in diesem Fall eine wichtigere Rolle spielt als ihre Hydrophobizität (Richter et al., 1991). In anderen Experimenten an der *Rhodospirillacea Rb. sphaeroides* hatte der Austausch von Tryptophanen gegen Phenylalanin an verschiedenen Positionen Auswirkungen auf die Assemblierung der dimeren Untereinheiten ($\alpha\beta$ oder $\beta\beta$) des LH1. Interessant ist, daß die Substitution gegen Phenylalanin in diesem Fall zu einer deutlichen Veränderung der spektralen Eigenschaften und der Assoziationskonstanten, d.h. der Stabilität des Dimers führte. Stites (1997) und Kehoe et al. (1998) sehen den Grund für die häufige Beteiligung des Tryptophans an Proteinasssemblierungen in dessen großem Beitrag zur Assoziationskonstante.

5.2 Stabilität und Eigenschaften modifizierter monomerer Pigment-Protein-Komplexe des Lhca1 und Lhca4

5.2.1 Der N-Terminus ist für die Bildung stabiler LHCs von Lhca1 und Lhca4 nicht essentiell

Deletiert man am N-Terminus bis zur dritten (Lhca1, Lhca1 Δ 36N) bzw. vierten (Lhca4, Lhca4 Δ 38N) Aminosäure der ersten Transmembranhelix, ist der Effekt eine Verringerung der Menge an stabilen monomeren Pigment-Protein-Komplexen. Mit der Deletion einer weiteren Aminosäure, Glutamat (Lhca1) und Tryptophan (Lhca4), sind im schwach denaturierenden Gel keine Monomere mehr nachweisbar. In Experimenten mit Deletionsmutanten des Lhcb1-Allels AB96 aus Erbse (*Pisum sativum*) fanden Cammarata und Schmidt (1992) keine Beeinträchtigung der Lhcb1-Monomerbildung, wenn der komplette extrinsische Bereich des N-Terminus entfernt wurde. Erst bei einer weiteren Verkürzung um acht Aminosäuren faltete das Protein nicht mehr bzw. bildete keine ausreichend stabilen Monomere mehr. Paulsen und Hobe (1992) zeigten für das AB80-Allel des Lhcb1, daß nach einer Deletion von elf Aminosäuren der ersten Transmembranhelix das LHCII-Monomer keinen stabilen Lichtsammelkomplex bildete. Die letzte Position, an der keine Bildung stabiler Monomere mehr möglich ist, war in diesen Arbeiten nicht genau bestimmt worden. Bis zu dem Punkt, an dem keine Monomerbildung im Gel nachweisbar war, blieb die Monomerbildungseffizienz des AB80 unbeeinflusst von der Deletion der terminalen Aminosäuren. Die durch die Deletionsexperimente am Lhca1 als entscheidend identifizierte Aminosäure Glutamat an Position 37 war auch in den beiden oberen Arbeiten in den ausschlaggebenden Regionen vorhanden. Als Anion einer Salzbrücke mit Arginin hat Glutamat im LHCII an Position 65 und 180 des Polypeptides eine wichtige strukturstabilisierende Funktion (Kühlbrandt et al., 1994). Im Falle der N-terminalen Deletionsmutante des Lhca1 wären mögliche Kandidaten für solch eine Wechselwirkung drei Lysinreste in der dritten Transmembranhelix, die im gefalteten Protein in relativer Nähe zum Glutamat liegen würden (Abb. 5.2-1).

Die Fähigkeit stabile monomere LHCs zu bilden, endet beim Lhca4 mit der Deletion der Aminosäure W-39, deren Vorkommen in diesem Bereich im Lhcb1 nicht konserviert ist. Im Rahmen der Dimerisierungsuntersuchungen ist W-39 des Lhca4 gegen Phenylalanin, Alanin, Glycin und Histidin ausgetauscht worden und wurde auch auf seine Monomerbildungsfähigkeit hin untersucht. Es konnte nach Auftrennung der monomeren Rekonstitutionsansätze im Gel beobachtet werden, daß nur die beiden Aminosäuren mit einem aromatischen Ringsystem, nicht aber Alanin und Glycin mit den kleinen Seitenketten stabile monomere LHCs bilden. Das bedeutet, daß kein ausgeprägter Zusammenhang zwischen der abnehmenden Hydrophobizität der Reste ($W = F > A > G > H$; Engelman et al., 1986) und der Faltung stabiler Monomere feststellbar ist, vielmehr scheinen sterische Effekte eine Rolle zu spielen.

Das humane Glycophorin A ist ein Membranprotein, bestehend aus zwei identischen Untereinheiten, die jeweils nur eine membrandurchgängige Helix bilden. McKenzie et al. (1997) erbrachten den Nachweis, daß die Assemblierung durch eine spezifische Interaktion helicaler Abschnitte stattfindet. Es ist vorstellbar, daß solche Wechselwirkungen auch Monomere, die aus zwei oder mehr Transmembranhelices bestehen, stabilisieren. Voraussetzung sind glycinreiche oder hydrophobe Regionen aus Aminosäuren mit kleinen Seitenketten in beiden Helices, deren Assoziierung über van der Waals Kräfte oder schwache Dipol-Interaktionen der polaren *backbone*-Atome vonstatten gehen können (Landolt-Marticorena et al., 1993).

Die Hypothese solcher Wechselwirkungen ist aus zwei Gründen für Lhca1 oder Lhca4 nicht zutreffend. Die Bereiche potentieller Interaktion weisen in beiden beteiligten Helices keine geeigneten Sequenzfolgen auf. Zusätzlich zeigt das Struktur-Modell des LHCII, stellvertretend für die beiden Lhca-Proteine, im Kreuzungsbereich keine Annäherung der Helices. Die Zwischenräume sind zwischen 5.3 und 16.7 Å (im Mittel ca. 11 Å) groß. Bei Abständen über 4 Å sind die Wechselwirkungen auf elektrostatische Interaktionen beschränkt und keine hydrophoben Wechselwirkungen mehr möglich (Krebs und Isenbarger, 2000).

Aus den Strukturdaten des LHCII (Kühlbrandt et al., 1994) geht hervor, daß die zwei kreuzartig angeordneten Luteine oder andere Xanthophylle (Hobe et al., 2000) im Protein für eine Stabilisierung des Monomers sorgen könnten. Lhca1 und Lhca4 besitzen jeweils nur ein Lutein (Schmid et al., 1997). Sequenzvergleiche deuten auf die Anwesenheit des dem Lutein 1 im LHCII entsprechenden Xanthophylls hin, dessen potentielle Aminosäure-Bindungspartner stark konserviert sind (Abb. 5.2-1). Die Daten aus den Deletionsexperimenten stützen diese Annahme, denn die Entfernung der potentiell Luteinbindenden Aminosäuren D-25 bis L-27 im Lhca1 bzw. D-26 bis L-28 (Abb. 5.2-2) im Lhca4 durch die Deletionen am N-Terminus führt nicht zum Verlust der Monomerbildung. Diese Beobachtungen wurden ebenso für die LHCII-Proteine AB80 (Paulsen und Hobe, 1992) und AB96 (Cammarata und Schmidt, 1992) gemacht, was zu dem Schluß führen kann, daß auch hier die Anwesenheit von zwei Luteinen nicht zwingend notwendig ist. Allerdings konnte in Untersuchungen der Pigmentzusammensetzungen von AB96-Wildtyp und seinen N-terminalen Deletionsmutanten keine Veränderung in der Pigmentstöchiometrie und somit kein Verlust von Lutein im LHC nachgewiesen werden (Cammarata und Schmidt, 1992), was damit begründet werden kann, daß dem Lutein eine von zwei Bindungsstellen ausreicht und eventuell weitere Wechselwirkungen mit der Protein-*backbone* vorhanden sind.

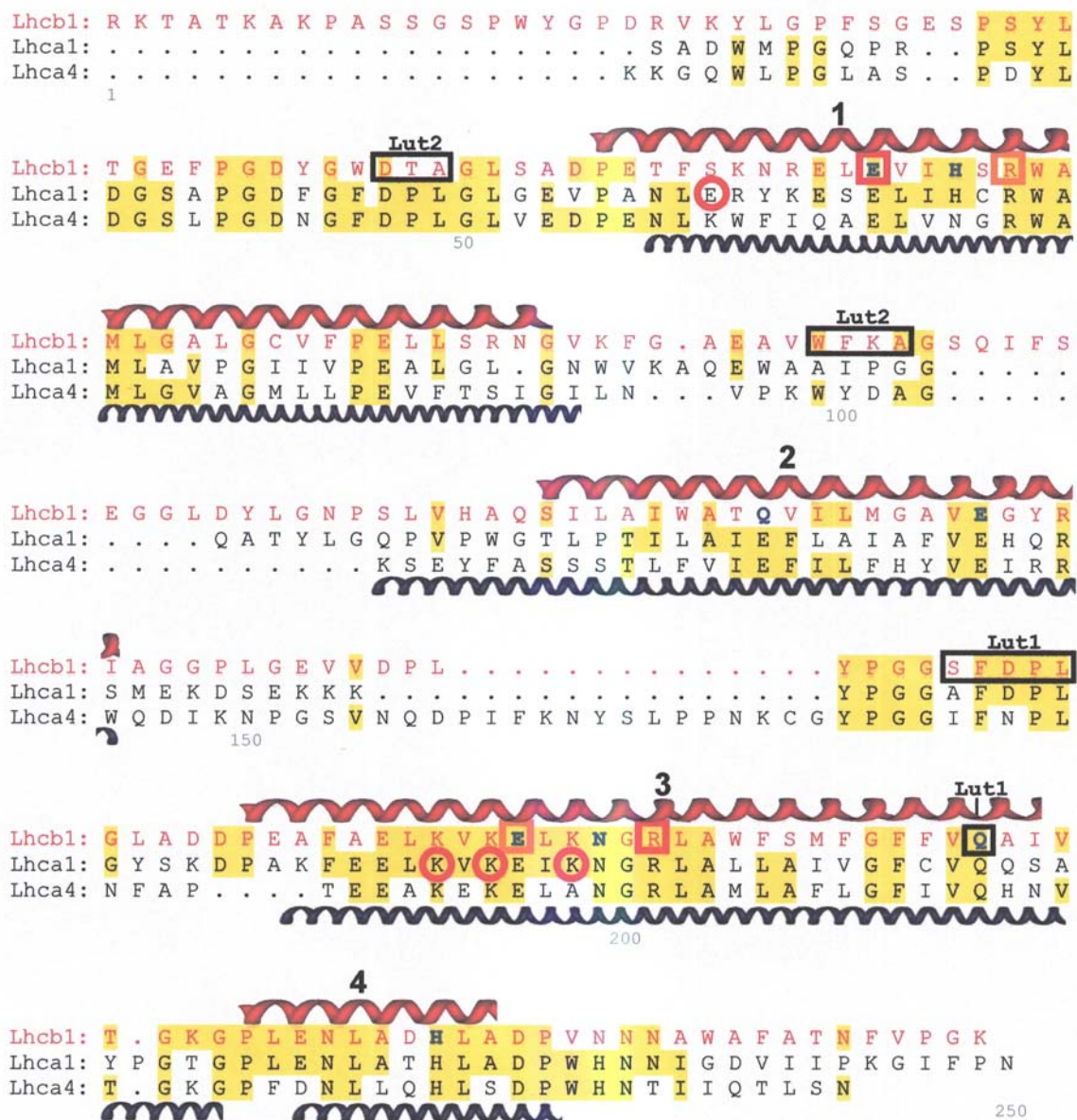


Abb. 5.2-1: Vergleich der Aminosäureabfolge von Lhcb1, Lhca1 und Lhca4 basierend auf den Daten einer potentiellen Sekundärstruktur für Lhca1 und Lhca4 von Green und Pichersky (1994) sowie Kühlbrandt et al. (1994). Die **gelb** markierten Bereiche kennzeichnen identische Aminosäuren. Die Transmembranhelices und die vierte amphiphatische Helix sind durch über (Lhcb1) und unter (Lhca1, Lhca4) den Sequenzen liegenden Schleifen markiert und von 1 bis 4 nummeriert. Mit roten () und orangenen () Kästchen eingerahmte Aminosäuren heben die Ionenpaare aus E und R hervor; ein roter (○) Kreis kennzeichnet eine potentielle Paarbildung im Lhca1 aus E-36 in der ersten Transmembranhelix und K-Resten in Transmembranhelix 3. Der schwarze Kasten () markiert die Lutein-Bindungsstellen im Lhcb1, die **blauen** Buchstaben die chlorophyllbindenden Aminosäuren nach Kühlbrandt et al. (1994).

Effekt der Proteinverkürzungen auf die Fluoreszenzemission und Chlorophyll-Stöchiometrie

Pigmente und Lhc-Apoproteine rekonstituieren zu komplexen LHCs, in denen die Chlorophylle durch Interaktion mit Aminosäureseitenketten und Einbindung in ein strukturiertes Protein optimal für Lichtabsorption und Energieweitergabe ausgerichtet

werden. Die monomeren Untereinheiten und der dimere LHCI-730 weisen spezifische Fluoreszenzemissionen und CD-Absorptionen auf. Daher ist es möglich, Einflüsse durch Proteinmodifikationen nachzuweisen, sofern diese sich im Spektrum manifestieren. Effekte auf die spektralen Eigenschaften eines LHCs werden immer als Vergleich von Wildtyp mit Mutante diskutiert.

Die terminale Verkürzung am Amino-Ende von Lhca1 (Lhca1 Δ 36N) hat keinen Effekt auf das Fluoreszenzemissionsspektrum (Abb. 4.2-2), d.h. die Entfernung dieser Regionen betrifft keine Chlorophyllbindungen im LHC oder die Ausrichtung der Chl zueinander sowie die Energieweiterleitung von Chl *b* auf Chl *a*. Die Chl-Verhältnisse der N-terminalen Lhca1-Mutante sind gleich dem Lhca1-Wildtyp, dennoch differieren die Gesamt-Chlorophyllmengen deutlich. Lhca1 Δ 36N bindet offensichtlich ca. 1.5 Chlorophylle mehr als der Wildtyp.

Das Spektrum der monomeren Minimalmutante (Definition, Kap. 4.2.1) des Lhca4 (Lhca4 Δ 38N) weicht deutlich vom Wildtypspektrum ab (Abb. 4.2-3). Die langwellige Fluoreszenz bei 725 nm nimmt ab, das Maximum bei 685 nm steigt an. Die Deletion des kompletten N-Terminus scheint direkt oder indirekt das langwellig fluoreszierende Chl bzw. die langwellig fluoreszierenden Chlorophylle des Lhca4 zu beeinflussen. Obwohl die Verkürzung des Proteins Lhca4 Δ 38N einen deutlichen Effekt auf die Fluoreszenzemission hatte, war sein Chl *a/b*-Verhältnis weder bei den photometrischen Quantifizierungen (Tab. 4.2-3) noch bei der HPLC-Messung (Tab. 4.2-4) gegenüber dem Wildtyp deutlich verändert. Allerdings war die Chlorophyll-Gesamtmenge gegenüber dem Wildtyp um fast 0.7 erhöht, die hauptsächlich durch eine Erhöhung der Chl *a*-Menge um etwa ein halbes Molekül pro Protein bedingt war. Dies hat eine leichte Veränderung des Chl-Verhältnisses zur Folge. Sollten weitere Datenerhebungen die bisherigen Ergebnisse bestätigen, könnte der erhöhte Chl *a*-Gehalt einen Hinweis auf die Verschiebung in der Fluoreszenzemission geben.

5.2.2 Deletionen am C-Terminus sind bis zum Ende der vierten Helix möglich

Für die Entfernung von Aminosäuren am C-Terminus von Lhca1 und Lhca4 gilt generell, daß die Bildung stabiler monomerer Komplexe etwa bis zum Ende der vierten Helix möglich ist. Der Lhca1 ist bis zur Deletion von drei weiteren Aminosäuren, P D A (Lhca1 Δ 20C), stabil, der Lhca4 toleriert nur die Entfernung von einem Prolin (Lhca4 Δ 12C) am Ende von Helix 4 (Abb. 5.2-2). Solche Beobachtungen wurden auch am Lhcb1 gemacht. Cammarata und Schmidt (1992) wiesen für AB96 nach, daß die Aminosäuren 204 bis 212 für die Bildung stabiler LHCII-Monomere essentiell sind (Abb. 5.2-1). Dieser Bereich schließt die amphipathische Helix mit ein. Paulsen und Hobe (1992) grenzten den Bereich für den Lhcb1 zunächst auf einen Tryptophan- und Serin-Rest am Ende der vierten Helix ein. Weitere Untersuchungen identifizierten schließlich Tryptophan als kritische Aminosäure. Austausch dieser Aminosäure im Vollängen-Lhcb1 gegen Phenylalanin, Alanin, Glycin und Histidin hatten keinen Effekt auf die LHC-Stabilität (Paulsen und Kuttkat, 1993). Das deutet darauf hin, daß dem Tryptophan nachfolgende Aminosäuren ebenso für die Stabilisierung eine Rolle spielen müssen. Tryptophan nimmt hier offensichtlich nicht, im Gegensatz zum Tryptophan am N-Terminus des Lhca4 (Kap. 5.2.1), eine Schlüsselfunktion für die Monomerbildung ein. Das bedeutet, daß am C-Terminus des Lhcb1 die Aminosäure Tryptophan für die Bildung des stabilen monomeren Lhcb1 nicht essentiell ist.

Die Fähigkeit zur Bildung stabiler Monomere des Lhca1 erlischt mit der Deletion des L-182 (Lhca1 Δ 20C). Was die Aminosäureaustausch-Experimente am C-Terminus des Lhcb1 für den Hauptlichtsammler des PSII beweisen (Cammarata und Schmidt, 1992), scheint auch auf den C-Terminus des Lhca1 zuzutreffen. Die Auftrennung der monomeren Rekonstitutionsansätze im schwach denaturierenden Gel dokumentiert eine deutliche

Abnahme an Monomerprodukt über einen weiten Bereich des C-Terminus hinweg (Kap. 4.2.1). Vermutlich liegen in dieser dem L-181 folgenden Region bereits Aminosäuren, die für die Konformation des Monomers wichtig sind (Abb. 5.2-2). Da Leucin nicht in der Lage ist mit anderen Aminosäuren polare Wechselwirkungen einzugehen, kommt ihr wahrscheinlich keine Bedeutung hinsichtlich der Ausbildung stabilisierender Ionen- oder Wasserstoffbrückenbindungen zu. Der stabilisierende Effekt von Leucin auf die vierte Helix hingegen, kann nur durch Aminosäureaustausche überprüft werden.

Vergleicht man die Ergebnisse von Lhca1 und Lhca4 mit den Daten von Lhcb1 zeigt sich, daß die Länge des terminalen Restes nach der vierten Helix nicht von Bedeutung zu sein scheint. Trotz des Einflusses weiterer Aminosäuren auf die Stabilität der Monomere, ist es Helix 4 selbst, die einen entscheidenden, stabilisierenden Effekt auf die ganze Untereinheit ausübt. Das demonstrieren auch die Ergebnisse der C-terminalen Deletionsmutanten des Lhca4. Die Entfernung der am Ende in Helix 4 gelegenen Aminosäure Aspartat führt zum Verlust der Bildung stabiler Monomere. Aspartat ist aufgrund seiner Seitenketteneigenschaften durchaus in der Lage ionische Wechselwirkungen einzugehen. Eine Destabilisierung oder auch der Verlust der Faltungsfähigkeit kann unmittelbar mit Aspartat zusammenhängen. Um diese Schlußfolgerung für den Lhca4 schließlich ausreichend zu stützen, wären Aminosäureaustausche an der Position 188 am C-Terminus des Lhca4 notwendig.

Auffällig ist, daß in den drei untersuchten cab-Proteinen Lhcb1 (Cammarata und Schmidt, 1992; Paulsen und Kuttkat, 1993), Lhca1 und Lhca4 die Deletion, die zum Verlust der Monomerbildungsfähigkeit führt, den Wegfall des, in allen drei Proteinen konservierten, Aspartats mit einschließt (Abb. 5.2-1). Daher ist es möglich, das letztlich in allen drei Fällen die Aspartat-Seitenkette, unabhängig von anderen Aminosäuren, an der Stabilisierung des Monomers beteiligt ist.

Effekt der Proteinverkürzungen auf die Fluoreszenzemission und Chlorophyll-Stöchiometrie

Die Deletionen an den Carboxy-Enden von Lhca1 und Lhca4 verändern die Fluoreszenzemission der LHCs nicht. Dagegen zeigten Messungen der Raumtemperatur-Fluoreszenzemission von AB96-Mutanten mit C-terminalen Deletionen von 15 bzw. 16 Aminosäuren (entspricht dem Proteinabschnitt unmittelbar hinter der vierten Helix) Verschiebungen von 3-4 nm in den kürzerwelligen Spektralbereich im Vergleich mit den Emissionsspektren vom AB96-Wildtyp (Cammarata und Schmidt, 1992).

Nur das Chl *a/b*-Verhältnis von Lhca4 Δ 12C wies eine signifikante Differenz zum Wildtyp auf. In dieser Deletionsmutante war das Chl *a/b*-Verhältnis um 0.23 nach photometrischer Quantifizierung und 0.15 nach HPLC-Messung geringer als im Wildtyp (Tab. 4.2-3 und 4.2-4). Die Chlorophyll-Gesamtmenge war, wie schon bei Lhca4 Δ 38N, erhöht und lag bei 9.2 Chl gegenüber 8.35 gebundenen Chl im Lhca4-Wildtyp. Das modifizierte Protein ist 189 Aminosäuren lang. Damit liegt dessen Ende nur wenige Aminosäuren von der potentiellen Chlorophyllbindestelle H-185 entfernt. Diese Position ist in vielen cab-Proteinen konserviert und wurde im LHCII als eine Chl *b*-Bindestelle beschrieben (Kühlbrandt et al., 1994). Bereits 1992 fanden Cammarata und Schmidt bei Deletion des Carboxy-Endes ab Aminosäure 213 in AB96 einen Effekt auf die Chl *a*-Bindung. Diese Position entspricht dem Deletionsbereich der Mutante Lhca4 Δ 12C, der letzten Mutante am C-Terminus des Lhca4, die noch zur Bildung von Monomeren fähig ist. Neuere Untersuchungen mit Aminosäureaustauschen an Lhcb1 und Lhcb4 zeigten für diese Proteine einen Verlust von Chl *a* und *b*, was in diesem Fall auf eine gemischte Bindestelle hindeuten würde (Yang et al., 1999; Remelli et al., 1999). Die Entfernung von Aminosäuren im Lhca4, die dem Asparagin-188 unmittelbar folgen, hat

aber, laut der ermittelten Chl *a/b*-Verhältnisse (Tab. 4.2-3), nur Einfluß auf die Bindung von Chl *a*. Daß es sich an der Position H-185 im Lhca4 wahrscheinlich um eine Chl *a*-Bindestelle handelt, demonstrieren Ergebnisse aus Untersuchungen von chlorophyllbindenden Aminosäuren im selben Protein. Dabei wurde H-185 als Bindungsstelle mit Präferenz für Chl *a* identifiziert (Thomé, 2000).

Die hier ermittelten Daten deuten eher auf eine Zunahme an Chl *b* als auf eine Abnahme an Chl *a* hin. Um dies genauer zu analysieren müßte ein größerer Stichprobenumfang untersucht werden.

Lhca1:

```
SADWMPGQPRPSYLDGSAPGDFGFDLGLGEVPANLERYKESELIHCRWA 50
MLAVPGIIVEALGLGNWVKAQEWAAIPGGQATYLGQPVPWGTLPTILAI 100
EFLAIAFVEHQRSMEKDSEKKKYPGGAFDPLGYSKDPAKFEELKVKEIKN 150
GRLALLAIVGFCVQSAYLGTGPLENLATHLADPWHNNIGDVIIPKGIFP 200
N 250
```

Lhca4:

```
KKGQWLPGLASPDYLDGSLPGDNGFDPLGLVEDPENLKWFIQAELVNGRW 50
AMLGVAGMLLPEVFTSIGILNVPKWYDAGKSEYFASSTLFVIEFILFHY 100
VEIRRWQDIKNPGSVNQDPIFKNYSLPPNKCGYPGGIFNPLNFAPTEEAK 150
EKELANGRLAMLAFLGFIVQHNVTGKGPFDNLLQHLSDPWHNTIIQTLSN 200
```

Abb. 5.2-2: Aminosäuresequenz von Lhca1 und Lhca4. Die farbigen Buchstaben bezeichnen die Aminosäuren, die nach Green und Pichersky (1994) die Transmembranhelices und die vierte amphipathische Helix bilden. **Helix 1**, **Helix 2**, **Helix 3**, **Helix 4**.

5.2.3 Terminale Deletionen haben bei Lhca1, Lhca4 und LHCII ähnliche Effekte

In Kapitel 1.4.1 wurde dargestellt, daß die monomeren Pigment-Protein-Komplexe des Lhca1 und Lhca4 vermutlich eine ähnliche Konformation annehmen wie der LHCII. Die auf der Konservierung von strukturbildenden Aminosäuren beruhende Annahme wird durch die, im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, gestützt. Für die Lhcb1-Allele des LHCII (AB80 und AB96) und die Untereinheiten des LHCI-730 ist der N-Terminus für die Monomerbildung entbehrlich (Cammarata und Schmidt, 1992; Paulsen und Hobe, 1992; Tab. 4.2-1A und 4.2-2A). Die Deletion bis zum Beginn der ersten Transmembranhelix hat in allen Fällen kaum einen Effekt auf die Chl-Interaktion. Die identischen Fluoreszenzemissionsspektren belegen dies für die untersuchten LHCs (Abb. 4.2-2 und 4.2-3; Cammarata und Schmidt, 1992) mit Ausnahme der N-terminalen Mutante Lhca4 Δ 38N (Abb. 4.2-3).

Am C-Terminus der oben genannten Proteine ist eine Deletion bis zum Beginn der vierten Helix möglich, eine komplette Entfernung der amphipathischen Helix hat den Verlust stabiler Monomere bei Lhcb1, Lhca1 und Lhca4 zur Folge (Cammarata und Schmidt, 1992; Paulsen und Hobe, 1992; Tab. 4.2-1B und 4.2-2B).

5.3 Der heterodimere LHCI-730 – Faktoren der Assemblierung

Die extrinsischen Bereiche der LHCs sind, neben der zweiten Transmembranhelix und den Schleifen, die Regionen geringster Homologie zwischen Lhcb1 sowie Lhca1 und Lhca4. Durch Sequenzvergleiche zwischen diesen drei Apoproteinen lassen sich 29.5% (Lhcb1:Lhca1) bzw. 30% (Lhcb1:Lhca4) Aminosäure-Identität ermitteln. Die Aminosäuren der luminalen Schleife jedoch sind nur zu 10.5% beim Vergleich Lhcb1:Lhca1 identisch. Bei einer Gegenüberstellung der Aminosäuren der luminalen Schleife von Lhcb1:Lhca4 sind zwar 33% der Aminosäuren in beiden Proteinen vorhanden, allerdings ist diese Region in der LHCI-Untereinheit um fast die Hälfte kürzer. Ebenso stark weicht der stromale Loop der LHCI-730 Untereinheiten vom dem des LHCII ab. Die stromal liegenden Schleifen von Lhca1 und Lhca4 sind mit ca. 45 Aminosäuren fast doppelt so lang wie die des LHCII.

Im Rahmen des Protein-Modelling für den Lhca4 ist eine hohe strukturelle Variabilität im Bereich der zweiten Transmembranhelix und dem nachfolgenden stromalen Loop nachgewiesen worden. Diese Tatsache kann als Indiz dafür gewertet werden, daß ihr eine besondere Bedeutung bei der Dimerisierung des LHCI-730 zukommt (Schweikardt, 2001).

5.3.1 Identifizierung dimerbildender Bereiche und Aminosäuren

Der Einfluß der Termini für die Dimer-Assemblierung läßt sich effektiv durch eine sukzessiv fortschreitende Verkürzung der Termini mittels Deletionsmutagenese untersuchen. Hobe et al. (1995) und Kuttkat et al. (1996) führten solche Arbeiten zur Trimerisierung des LHCII bereits durch und fanden interessante Zusammenhänge zwischen einer Aminosäureabfolge bzw. einer bestimmten Aminosäure und der Trimerisierungsfähigkeit der monomeren Untereinheiten. So lag es nahe, zunächst die extrinsischen Proteinabschnitte hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Dimerassemblierung in beiden Untereinheiten des LHCI-730 zu untersuchen. War die minimale Proteinlänge an N- und C-Terminus von Lhca1 und Lhca4 bestimmt, wurde die Aminosäure, mit deren Deletion die Dimerbildung nicht mehr möglich war, im Vollängenprotein ausgetauscht. Mit Hilfe dieser Versuche ließ sich die Bedeutung der kritischen Aminosäure für die Dimerassemblierung ermitteln.

5.3.1.1 Die Bedeutung der N-Termini von Lhca1 und Lhca4 für die Dimerisierung

Die Assemblierung zu stabilen Dimeren ist nur möglich, wenn am N-Terminus des Lhca1 nicht mehr als drei Aminosäuren entfernt werden (Lhca1 Δ 3N). Wie die elektrophoretischen Auftrennungen zeigen, verhindert die Deletion des folgenden Tryptophans (Lhca1 Δ 4N) die Bildung eines Dimers (Abb. 4.3-1). Daß das Tryptophan nur gegen Phenylalanin ausgetauscht werden kann, ohne die Fähigkeit zur Dimerbildung zu verlieren, macht seine signifikante Stellung an dieser Position um so deutlicher. Beide Aminosäuren haben Seitenketten mit einem Benzolring, vor allem haben sie fast identische Hydrophobizität (Engelman et al., 1986). Die Spezifität des Tryptophans an dieser Position und dessen Eigenschaft Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, würde Wechselwirkungen mit einem distinkten Bindungspartner im Lhca4 möglich machen. Allerdings führt ein Austausch gegen Phenylalanin nicht zur Reduzierung der Dimerisierungseffizienz (Abb. 4.3-5). Jedoch ist Phenylalanin nicht in der Lage Interaktionen über Wasserstoff zu vermitteln, so daß man eher hydrophobe Wechselwirkungen als ausschlaggebend für die Dimerbildung annehmen muß. Das W-4 im Lhca1 dürfte somit trotz aller Spezifität nicht der einzige Faktor sein, der die Assemblierung zum LHCI-730 vermittelt. Eine optimale Ausrichtung der extrinsischen Region durch Tryptophan, das den N-Terminus z.B. in der Membran verankert, und damit

eine Wechselwirkung N-terminaler Strukturen des Lhca1 mit einem bestimmten Bereich auf dem Lhca4 ermöglicht, wäre denkbar. Dies wäre eine Funktion, die aufgrund ähnlicher Hydrophobizität auch alternativ von Phenylalanin erfüllt werden könnte.

Ein potentieller Wechselwirkungspartner für N-terminale Aminosäuren des Lhca1 ist das Amino-Ende am Lhca4. Die Deletionsmutagenese ergab, daß sowohl für die Faltung stabiler monomerer LHCs als auch für die Bildung von Dimeren der N-Terminus des Lhca4 bis zum W-39 deletiert werden kann. Der Austausch von Aminosäuren an dieser Position zeigte keinen Effekt auf die Dimer-Bildungsfähigkeit der Untereinheit. Allerdings ließ der Einbau von Alanin und Glycin die Bildung stabiler monomerer Pigment-Protein-Komplexe nicht zu. Diese Daten könnte man so interpretieren, daß die Deletion von mehr als 38 Aminosäuren am N-Terminus des Lhca4 die monomere Untereinheit destabilisiert bzw. die Faltung des Monomers verhindert. Das Ausbleiben der Dimerisierung ist in diesem Fall durch die Instabilität bzw. verhinderte Faltung des Lhca4 bedingt. Aminosäuresubstitutionen an Position 39 des Lhca4 gegen Alanin oder Glycin können aber, möglicherweise durch Wechselwirkung von Lhca1 mit dem, in diesem Fall noch vorhandenen, N-Terminus des Lhca4, im Dimer kompensiert werden.

Die Dimerbande von Lhca4 Δ 38N mit Lhca1-Wildtyp war im Dimerisierungsexperiment gegenüber Vergleichsbanden aus Lhca1- und Lhca4-Wildtyp-Rekonstitutionen deutlich reduziert (Abb. 4.3-3). Diese Abnahme kann mit einer von N-terminalen Aminosäuren des Lhca1 direkt oder indirekt vermittelten Assoziierung mit N-terminalen Bereichen am Lhca4 erklärt werden. Diese Interaktion scheint nicht die einzige Wechselwirkung zu sein, denn sonst wäre im schwach denaturierenden Gel keine Dimerbande nachweisbar. Deshalb müssen noch weitere Interaktionen existieren, die das Dimer stabilisieren. Eine Wechselwirkung von Aminosäuren der N-terminalen Lhca1-Region mit dem Loop zwischen Helix 2 und Helix 3 des Lhca4 ist wahrscheinlich.

Einfluß der Proteinverkürzungen an den N-Termini auf die 77 K Fluoreszenzemission

Die Emissionsspektren der Dimere mit den kritischen N-terminalen Deletionsmutanten des Lhca1 (Lhca1 Δ 3N) und Lhca4 (Lhca4 Δ 38N) zeigten sich im Vergleich zu den Spektren des Wildtyp-Dimers durch die Verkürzung der Proteine unbeeinflusst. Wie zu erwarten war, hat eine Deletion von nur drei Aminosäuren im Lhca1 Δ 3N keinen Effekt auf die Energieweiterleitung von Chl *b* auf Chl *a*. Gestützt wird diese Annahme durch zwei experimentelle Befunde. Die Dimerisierungseffizienz der Mutante Lhca1 Δ 3N war fast identisch mit dem Wildtypdimer (Abb. 4.3-1), und der monomere Lhca1 Δ 36N, der als letzte Deletionsmutante noch stabile Monomere bildete und um 33 Aminosäuren kürzer als das Protein des Lhca1 Δ 3N ist, zeigte keinen Unterschied zum Fluoreszenzemissionsspektrum des Lhca1-Wildtyps (Abb. 4.2-2). Anders verhält es sich für den Lhca4 Δ 38N. Die Stabilität von monomeren und dimeren LHCs war bei dieser Deletionslänge schon deutlich reduziert (Abb. 4.2-3 und 4.3-3) und das Fluoreszenzemissionsspektrum des monomeren Lhca4 Δ 38N war, ohne einen signifikanten Einfluß auf das Chl *a/b*-Verhältnis zu haben, deutlich verändert. Das langwellige Emissionsmaximum des monomeren Lhca4 Δ 38N war deutlich reduziert und die kürzerwellige Emission verstärkt (Abb. 4.2-3). Von dieser Abweichung ist im Emissionsspektrum des Lhca4 Δ 38N-Dimers nichts mehr zu sehen (Abb. 4.3-8B), was auf einen Stabilisierungseffekt durch den Lhca1-Wildtyp hinweist. Die Chl-Verhältnisse bleiben auch hier fast unbeeinflusst.

5.3.1.2 Involvierung der C-Termini in die Dimerbildung

Beim Lhca1 endet die kürzeste dimerbildende C-terminale Deletionsmutante an Position 185 (Lhca1 Δ 16C; Abb. 4.3-2), wie am N-Terminus des Lhca1 und Lhca4, mit einem Tryptophan.

Untersuchungen der Dimerbildungseffizienzen C-terminaler Deletionsmutanten des Lhca1 ergaben, daß schon bei kürzeren Deletionen, bei denen die Mutanten noch Dimere bilden, die Dimerausbeute mit fortschreitender Deletionslänge deutlich abnimmt (Abb. 4.3-2 und Tab. 4.3-2). Die Ergebnisse der Punktmutationen demonstrieren, daß Tryptophan an dieser Stelle nicht essentiell ist, da der Austausch des W-185 die Dimerisierung nicht unterbindet (Abb. 4.3-5). Diese Ergebnisse der Aminosäuresubstitutionen und die Reduzierung der Dimerausbeuten im schwach denaturierenden Gel weisen darauf hin, daß im Falle der Dimerisierung am C-Terminus des Lhca1 die spezifischen Eigenschaften der Aminosäure Tryptophan alleine nicht ausschlaggebend sind, um eine spezifische Interaktion für die Assemblierung der Untereinheiten zu vermitteln. Vielmehr scheinen mehrere Aminosäuren an einer Wechselwirkung beteiligt zu sein. Beim Lhcb1 dagegen fand Kuttkat (1997) in Aminosäure-Austauschexperimenten an W-222 einen konkreten Zusammenhang zwischen der Hydrophobizität der eingebauten Aminosäuren und der Trimer-Bildung des Lhcb1. Die Möglichkeit einer Wechselwirkung der Aminosäuren W-222 und H-212 durch delokalisierte π -Elektronen der aromatischen Ringsysteme, die auch von Phenylalanin in Position 222 vermittelt werden könnte, wurde diskutiert. Solche Interaktionen sind auch zwischen Lhca1 und Lhca4 theoretisch möglich, da die Aminosäuren W-222 und H-212 in den LHCI-730 Untereinheiten (H-181 und W-185 im Lhca1; H-185 und W-190 im Lhca4) Homologe besitzen. Diese Wechselwirkungen, die bei einigen α -helicalen Proteinen nachgewiesen worden sind (Loewenthal et al., 1992; Sancho et al., 1992) scheinen aber keine große Bedeutung für die Assemblierung sowohl von Lhcb1 noch von Lhca1/Lhca4 zu haben, denn Punktmutanten mit Substitutionen von H-212 im Lhcb1 bzw. H-185 im Lhca4 bilden weiterhin Trimere bzw. Dimere (Yang et al., 1999; Abb. 4.3-7B).

Neben seinen ausgeprägten hydrophoben Eigenschaften kann das Tryptophan mittels seiner Imino-Gruppe auch durch Wasserstoffbrücken interagieren. Dadurch könnte es direkt mit einer anderen Aminosäure einer entfernten Peptidkette interagieren (Schiffer et al., 1992; Yau et al., 1998). Wie die Punktmutationen zeigen, findet eine solche Wechselwirkung zwischen Lhca1 und Lhca4 nicht statt, denn sie müßte durch den Einbau von Phenylalanin, Alanin oder Glycin an Position 185 im Lhca1 die Bildung stabiler Dimere unterbinden.

W-185 liegt unmittelbar an der postulierten Helixgrenze, daher könnte ein Zusammenhang von fehlender Monomerstabilität mit Dimer-Bildungsfähigkeit vermutet werden (Kap. 5.2.2). Da die letzte dimerbildende Mutante Lhca1 Δ 16C vier Aminosäuren länger ist als das kürzeste Protein, das in den Untersuchungen stabile monomere Pigment-Protein-Komplexe bildete (Lhca1 Δ 20C; Tab. 4.2-1) und die entsprechenden Punktmutanten ebenfalls eine Monomerbande nach elektrophoretischer Auftrennung zeigten, kann ein Ausbleiben der Assemblierung aufgrund fehlender Monomerstabilität ausgeschlossen werden.

Durch die oben beschriebenen Eigenschaften kann Tryptophan mit seinem hydrophoben Benzolring in die Lipidmembran „eintauchen“ und die Peptidkette gleichzeitig durch Wasserstoffbrückenbindungen mit polaren Lipidbestandteilen verankern. Kuttkat (1997) diskutierte für den Lhcb1 eine dadurch bedingte Stabilisierung der trimeren Konformation und verweist auf die unmittelbare Nähe des W-222 zur Thylakoidmembran. In den Untereinheiten des LHCI-730 ist die Lokalisierung des Tryptophans ähnlich (Abb. 5.2-1). Allerdings kann Tryptophan gegen Aminosäuren mit anderen Eigenschaften ausgetauscht werden, ohne daß die Dimerbildung beeinflusst wird.

Der C-Terminus des Lhca4 nimmt in vielerlei Hinsicht eine Sonderstellung ein. i) Eine Dimerbildung ist möglich, obwohl die monomere Untereinheit nicht mehr stabil ist. ii) Die Assemblierung ist, trotz Deletion über Helix 4 hinweg, möglich. iii) Eine Deletion von 9 Aminosäuren der dritten Transmembranhelix wird toleriert. iv) Tryptophan ist nicht die kritische Aminosäure, sondern Isoleucin. Die Deletionsmutanten Lhca4 Δ 13C bis Δ 32C falten nicht mehr zu stabilen monomeren LHCs (Tab. 4.3-3B). Sie assemblieren aber mit dem

Wildtyp-Lhca1 zu Dimeren, selbst dann, wenn die beiden Untereinheiten zuvor einzeln rekonstituiert worden sind. Das bedeutet, entweder bilden sich Monomere aus, die durch die Gelelektrophorese in Abwesenheit von Lhca1 zerstört werden, aber in Gegenwart von Lhca1 stabilisiert werden können, oder der instabile monomere Komplex wird durch den Lhca1 nachträglich in eine Konformation gezwungen, die eine Dimer-Assemblierung möglich macht. Ein Effekt auf die Dimerbildung, der auf den spezifischen Eigenschaften des Isoleucins beruht, ist unwahrscheinlich. Diese Annahme unterstützen die Daten der Aminosäuresubstitutionen, wo weder bei der Bildung der Monomere noch bei der Dimerisierung große Stabilitätsschwankungen beim Austausch des Isoleucins zu beobachten waren (Abb. 4.3-6A und B). Die ausbleibende Dimerbildung ist offensichtlich eine Folge der zu starken Verkürzung des Lhca4, die entweder, die zur Assemblierung notwendigen Aminosäuren entfernt hat, oder die Stabilität des Monomers zu stark beeinträchtigt. Die Deletion der Aminosäuren ¹⁶⁹V Q H (Lhca4Δ32C) beinhaltet allerdings auch die potentielle Lutein 1-Bindestelle Q-170 in der dritten Helix des Lhca4 (Abb. 5.2-1). Die Dimerbildung ist gegenüber der vorangehenden Mutante Lhca4Δ29C um fast 30% reduziert und die Dimerisierungseffizienz sogar um sogar 64%. Dieser Effekt könnte durch die Entfernung des Q-170 hervorgerufen worden sein.

Effekt von Proteindeletionen auf die spektroskopischen und pigmentbindenden Eigenschaften

Die Deletion von 16 Aminosäuren am C-Terminus des Lhca1 (Lhca1Δ16C) hat eine Reduzierung und eine Verschiebung des langwelligen Emissionsmaximum des Dimers zur Folge (Abb. 4.3-8A). Entfernt man 32 Aminosäuren am C-Terminus des Lhca4 (Lhca4Δ32C) so hat das, trotz Deletion bis in die dritte Transmembranhelix, keinen Einfluß auf die Fluoreszenzemission der C-terminalen Mutante Lhca4Δ32C (Abb. 4.3-8B). Die Auswirkung der Reduzierung um 16 Aminosäuren am C-Terminus des Lhca1 auf das Emissionsspektrum ist um so bemerkenswerter, da keine potentielle chlorophyllbindende Aminosäure deletiert wurde. Bezieht man allerdings die Ergebnisse aus den gelelektrophoretischen Auftrennungen mit ein, die ergaben, daß die Dimerstabilität über einen längeren Bereich des Carboxy-Terminus bis zur Mutante Lhca1Δ16C stetig abnimmt, so läßt dies auf einen konformationsbedingten Effekt schließen, der neben der Stabilität des Dimers die Chlorophyllbindungen indirekt beeinflussen könnte. Welche Auswirkungen dieser Effekt haben könnte, zeigen die Berechnungen zur Protein/Chlorophyll-Stöchiometrie (Tab. 4.3-6). Die Gesamt-Chlorophyllmenge ist im Komplex um genau 50% gegenüber dem Wildtyp reduziert. Das könnte bedeuten, daß eine Untereinheit praktisch chlorophyllfrei ist. Unterstützt werden diese Befunde durch die CD-Spektren. Ein Vergleich von Wildtyp-Dimer-Signal mit Lhca4-Wildtyp-Monomer-Signal und Lhca1Δ16C-Dimer-Signal in Abb. 5.3-1 weist darauf hin, daß die excitonischen Chlorophyllkopplungen in der Lhca1-Untereinheit des dimeren Lhca1Δ16C-Komplex verloren gegangen sind, denn dessen Signal entspricht fast dem des monomeren Lhca4-Wildtyps. Die Mutante Δ32C des Lhca4 besitzt ebenfalls nur noch die Hälfte der Wildtyp-Chlorophyllmenge pro Dimer (Tab. 4.3-6), ohne daß das CD- oder Fluoreszenzemissionsspektrum (Abb. 4.3-8B) davon beeinflusst wäre. Die Bewertung der Daten zur Protein/Chlorophyll-Stöchiometrie ist allerdings kritisch. Durch die Aufkonzentrierung der aus dem Saccharosedichtegradienten isolierten Proben der schwachen Mutantenbanden erhöht sich die Detergenzkonzentration²⁰. Der verwendete BCA-Assay wurde zwar wegen seiner Toleranz gegenüber Detergentien benutzt, doch kann

²⁰ Bei einer Verdopplung der Proteinkonzentration kommt es zu einer Erhöhung der Detergenzkonzentration um ca. 66% (V. Schmid, persönliche Mitteilung).

nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob zu hohe Konzentrationen die spektroskopische Messung stören. Zusätzlich können noch vorhandene in der Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation co-sedimentierte bakterielle Proteine durch eine Aufkonzentration ebenfalls selektiv angereichert werden und den Proteinanteil gegenüber den Chlorophyllen erhöhen.

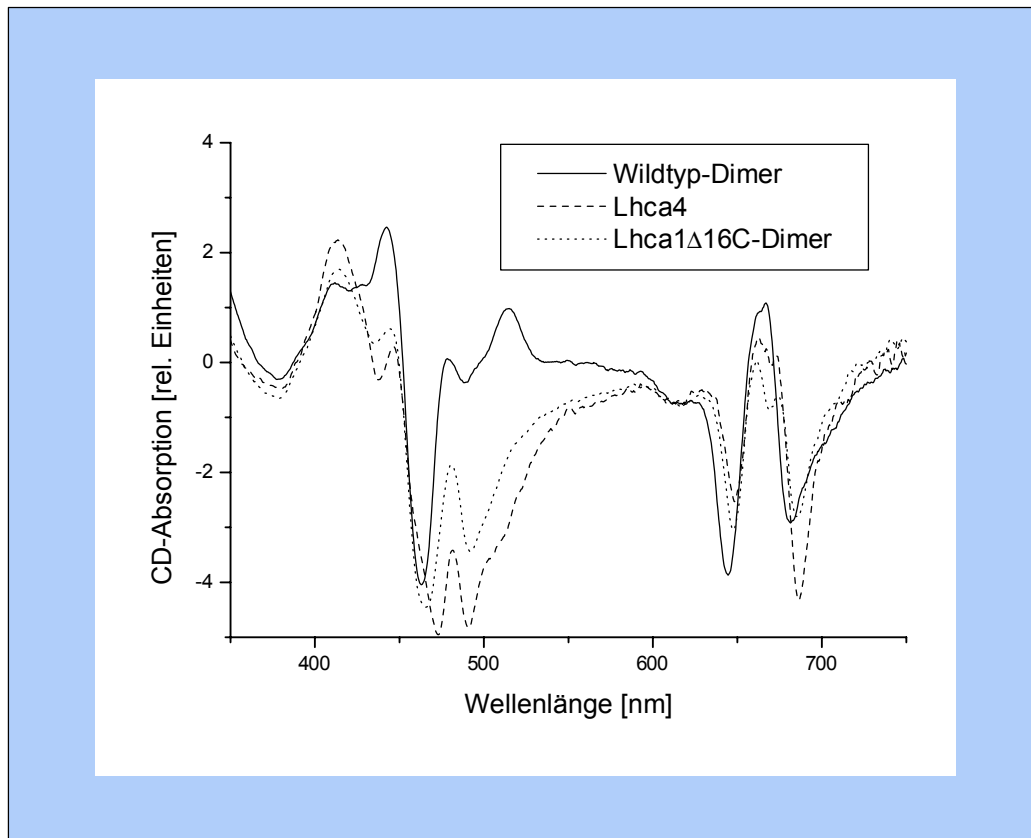


Abb. 5.3-1: Vergleich der CD-Spektren im sichtbaren Wellenlängenbereich von Wildtyp-Dimer, Lhca4-Monomer und Lhca4Δ16C-Dimer.

Eine mögliche Interpretation für die Reduktion langwelliger Fluoreszenzemission im Dimer des Lhca1Δ16C und das Vorhandensein derselben in den Dimeren mit den Minimallängenmutanten des Lhca4 (Lhca4Δ38N und Lhca4Δ32C) weicht von der bisherigen Annahme ab, daß die langwellig fluoreszierenden Chlorophylle des LHCI-730 vom Lhca4 stammen (Tjus et al., 1995; Schmid et al., 1997). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß der Lhca1 der Träger des langwellig emittierenden Chlorophylls wäre und die langwellige Emission ein Effekt, der erst nach einer Assemblierung mit dem Lhca4 auftritt. Die Beobachtung, daß die maximale Fluoreszenzemission des Lhca4-Monomers gegenüber dem des Dimers um 5 bis 10 nm verschoben ist (Schmid et al., 1997; eigene Daten), deutet auf einen Effekt hin, der durch die Assemblierung von Lhca1 und Lhca4 zustande kommen könnte. Inwieweit die Dimerisierung die Konformation der selbständigen Monomere verändert, ist derzeit nicht bekannt.

5.3.1.3 Bedeutung der Punktmutationen für die Dimerbildung

Neben den terminalen Deletionsmutanten hatten auch punktspezifische Veränderungen am Lhca4 einen Einfluß auf die Fluoreszenzemission des Dimers. Dabei kam es zu kleinen Verschiebungen im Emissionsmaximum bei 735 nm, vor allem aber die Reduktion dieses Maximums gegenüber dem Peak bei 686 nm war augenfällig. Kleine Variationen in der Lokalisierung des absoluten Emissionsmaximums bei 735 nm deuten schon auf geringe Konformationsänderungen der LHCs hin. Die weitere Reduktion dieses Signals beweist eine Destabilisierung der Lhca4-Untereinheit im dimeren Komplex, die eine erhöhte Emission der Lhca1-Untereinheit bei 686 nm zur Folge hat (Abb. 5.3-2). Die Energieweiterleitung innerhalb des dimeren Komplexes wird also durch den Austausch von Tryptophan gegen die Aminosäuren $F > H > G > A$ zunehmend gestört. Die Ergebnisse sind nahezu übertragbar auf die Befunde der Gelaufftrennungen. Zwar konnten für alle Lhca4-Punktmutanten Dimere isoliert werden, jedoch verhinderte die Substitution von Tryptophan durch Alanin und Glycin die Bildung von stabilen Lhca4-Monomeren (Abb. 4.3-6A und B). Gerade die Punktmutanten, die keine stabilen Monomere falten, zeigen im Emissionsspektrum kein (Lhca4W39A) bzw. kaum (Lhca4W39G) ein charakteristisches LHCI-730-Signal. Die Histidin-Austauschmutante, die nur eine geringe Monomer-Bildungseffizienz zeigte, nimmt eine Mittelstellung ein, da Charakteristika der Lhca1- und Lhca4-Fluoreszenzemission vorhanden sind.

Die Tryptophan-Substitution an Position 39 des Lhca4 deutet auf einen Zusammenhang zwischen der Monomerstabilität des Lhca4 im Dimer und der langwelligen Fluoreszenzemission hin. Die entscheidenden Merkmale der Aminosäureseitenketten, die die Bildung eines stabilen Dimers bzw. Monomers ermöglichen, scheinen in diesem Fall die Hydrophobizität und die sterischen Eigenschaften der jeweils eingebauten Aminosäure an dieser Position zu sein. Nur die Austauschmutanten, die an Position 39 Aminosäuren mit aromatischem Ringsystem besitzen, zeigen Monomerbildung und vergleichsweise ähnliche Emissionsspektren wie der Wildtyp. Mit abnehmender Hydrophobizität und geringerem Seitenkettenvolumen verändern sich die Signale zu einem reinen Lhca1-Spektrum (Abb. 5.3-2).

Die Ergebnisse der Aminosäureaustausche am N-Terminus des Lhca4 beweisen auch, daß die Assemblierung zu einem dimeren LHC möglich ist, obwohl eine Untereinheit weder für sich alleine, noch fraglicherweise, im Dimer seine native Faltung einnimmt. Strukturen und Aminosäuren, die die Interaktion mit dem Dimerpartner ausbilden, scheinen in den beschriebenen Beispielen weiterhin vorhanden, bzw. so ausgerichtet zu sein, daß sie wechselwirken können. Unter diesen Gesichtspunkten scheint auch die verkürzte C-terminale Lhca4-Untereinheit tatsächlich nicht mehr im nativem Zustand gefaltet sein zu müssen, um mit dem Lhca1 zum Dimer zu assoziieren (Kap. 5.3.1.2 und 5.3.1.5).

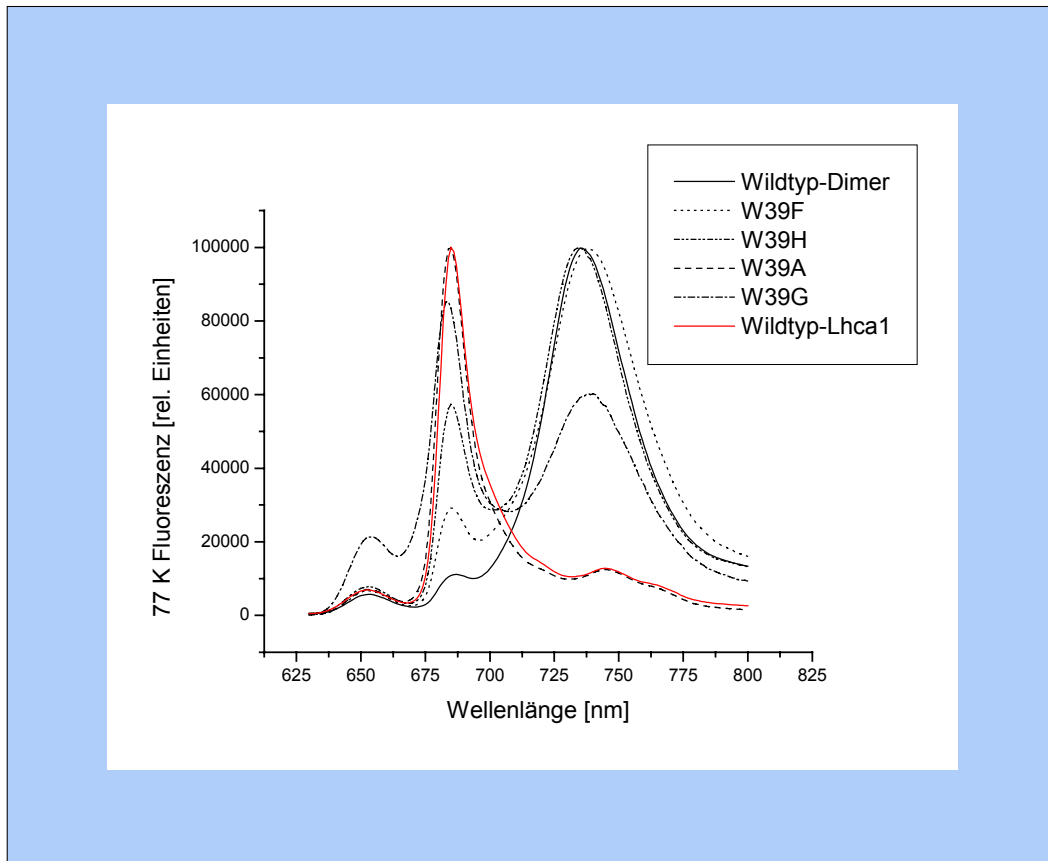


Abb. 5.3-2: Vergleich der Fluoreszenzmissionsspektren der dimeren N-terminalen Punktmutanten des Lhca4 mit dem Spektrum des monomeren Lhca1. Die Graphik zeigt, daß das Emissionsspektrum der Punktmutanten sich dem der monomeren Lhca1-Untereinheit angleicht.

5.3.1.4 Einfluß des Cofaktors Chlorophyll auf die Dimerstabilität

Die Chlorophylle sind wesentliche Faktoren für die Rekonstitution von Lichtsammelkomplexen höherer Pflanzen. Bereits 1987 bewiesen Plumley und Schmidt, daß eine Rückfaltung von dem aus Thylakoiden gewonnenem und denaturiertem LHCII unter Zugabe von Pigmenten möglich ist. Und Paulsen et al. (1993) demonstrierten mittels rekombinantom Apoprotein, daß Pigmente die Rekonstitution von SDS-denaturiertem LHCP auslösen. Diese Beispiele zeigen, daß die Bindung von Chromophoren einen wesentlichen Beitrag zur Komplexstabilität liefert. In neuerer Zeit versucht man chlorophyllbindende Aminosäuren auszutauschen²¹, um in anschließenden Analysen den Effekt auf die Pigmentzusammensetzung untersuchen zu können (Rogl und Kühlbrandt, 1999; Yang et al., 1999; Bassi et al., 1999). Die Konsequenzen können so stark sein, daß sie die Stabilität des monomeren oder auch oligomeren Komplexes beeinträchtigen.

²¹ In der Kristallstruktur des LHCII (Kühlbrandt et al., 1994) wurden die Aminosäuren, die mit Chlorophyllen wechselwirken, identifiziert. Die Auflösung von 3.4 Å erlaubt allerdings keine Differenzierung zwischen den beiden Chlorophyllspezies.

Tab. 5.3-1: Übersicht über Monomer- und Dimerbildungsfähigkeit von Austauschmutanten der Transmembranhelices und amphipathischen Helix des Lhca4. Aminosäuren an potentiell chlorophyllbindenden Positionen wurden im Rahmen zweier Diplomarbeiten (Lago-Places, 2000 und Thomé, 2000) zur Erforschung der Fluoreszenzeigenschaften des Lhca4 ausgetauscht und in dieser Arbeit hinsichtlich ihres Einflusses auf Dimerbildung und Stabilität untersucht. Die Daten der Monomerstabilität der Komplexe entstammen diesen beiden Arbeiten.

Klon	Lokalisierung	Monomer	Dimer
E44L E44S	Helix 1	- -	- -
N47L	Helix 1	-	-
E94S	Helix 2	+	+
E102L E102S	Helix 2	- -	- -
E153G E153L N156S	Helix 3	- - +	- - +
Q170G	Helix 3	+	+
H185L	Helix 4	+	+

Im Rahmen zweier Diplomarbeiten (Lago-Places, 2000; Thomé, 2000) wurden Punktmutanten des Lhca4 hergestellt und hinsichtlich ihrer Chlorophyllbindung und langwelligen 77 K Fluoreszenzemission untersucht. Diese Mutanten wurden für die vorliegende Arbeit herangezogen, um ihre Effekte auf Monomerbildung und Dimer-Assemblierung zu untersuchen. Die Assoziierung zum Dimer bestehend aus Wildtyp-Lhca1 und Austauschmutanten des Lhca4 war nur in den Fällen möglich, in denen die Lhca4-Punktmutante stabile monomere Komplexe bildete (Tab. 5.3-1). Das bedeutet, daß für die durchgeführten Aminosäureaustausche nur Auswirkungen auf die Faltung der Untereinheit nachgewiesen werden können, aber nicht – neben ihrer Rolle als potentiell chlorophyllbindende Aminosäuren – zusätzliche Auswirkungen auf die Dimer-Assemblierung belegbar sind. Ein solcher Einfluß konnte am Lhcb1 gefunden werden. Der Austausch von H-68 des Lhcb1 gegen Phenylalanin oder Leucin hatte zur Folge, daß trotz Faltung monomerer Einheiten, keine Trimere gebildet werden konnten (Yang et al., 1999). Die Autoren machten dafür die besondere Lokalisierung der chlorophyllbindenden Seitenkette verantwortlich. Diese liegt im trimeren LHC im Zentrum der Grenzfläche mit den beiden anderen Untereinheiten so, daß die gebundenen Chlorophylle a^5 aller drei Untereinheiten miteinander wechselwirken können und das Trimer stabilisieren (Kühlbrandt, 1994). Der Position H-68 im Lhcb1 entspricht N-47 im Lhca4. Der Effekt des Aminosäurewechsels im Lhca4 ist an dieser Stelle so stark, daß keine Faltung oder Bildung stabiler Monomere stattfinden kann. Eine ähnliche Konformation wie sie beim LHCI postulierte wird, nämlich die Ausrichtung der Helix 1 zu einem gemeinsamen Zentrum hin, kann somit nicht belegt werden, ist aber dennoch nicht unwahrscheinlich, da ein dem H-68 des Lhcb1 entsprechendes Histidin an Position 46 im Lhca1 vorhanden ist. Der Austausch von Aminosäuren an dieser Stelle könnte zu ähnlichen Ergebnissen führen wie beim Lhcb1 und einen nicht so elementaren Einfluß auf die Monomerstabilität haben wie N-47 am Lhca4.

Untersuchungen zur Chlorophyll/Protein-Stöchiometrie deuten daraufhin, daß im dimeren Pigment-Protein-Komplex ein Chl mehr bindet als aus der Addition der Chl der Untereinheiten zu vermuten wäre (Schmid et al., 1997). Dieses Chl könnte durchaus an der Wechselwirkung der Untereinheiten beteiligt sein. Da die Lokalisierung der potentiell Chl-bindenden Aminosäure nicht bekannt ist, könnte diese im Rahmen der Proteinverkürzungen

entfernt worden sein. Mit der Deletion dieser Aminosäure könnte ein Effekt auf die Stabilität des Dimers ausgeübt werden, der wie im Fall des Lhcb1, die Dimerbildung verhindert.

5.3.1.5 Bedeutung stabiler monomerer Komplexe für die Bildung von Dimeren

Zu Beginn dieser Arbeit und als Anhaltspunkt für die Durchführung der Experimente zur Dimerisierung von Lhca1 und Lhca4 wurde vorausgesetzt, daß die Assemblierung aus den Untereinheiten nur möglich ist, wenn Lhca1 und Lhca4 Monomere bilden. Im Falle der C-terminalen Deletionsmutanten des Lhca4 zeigte sich zum ersten Mal, daß ein instabiles Monomer – ab dem Klon Lhca4 Δ 13C – durchaus zu einem stabilen Dimer assemblieren kann. Dieser Effekt scheint, nach den bisherigen Untersuchungen, nur auf den Lhca4 beschränkt zu sein und zeigt sich, sowohl am C-Terminus, als auch bei den Aminosäureaustauschen am N-Terminus des Proteins (Kap. 5.3.1.2 und 5.3.1.3). Es ist bemerkenswert, daß die Dimerbildungseffizienz der Punktmutanten keinerlei Hinweis auf das Ausbleiben einer Monomerbildung in der Rekonstitution der Untereinheiten gibt. Die Dimerausbeute ist bei allen LHCs identisch mit dem Wildtyp (Abb. 4.3-6A und B).

Die elektrophoretische Auftrennung von Pigment-Protein-Komplexen in schwach denaturierenden Polyacrylamidgelen kann trotz schonender Bedingungen semi-stabile Komplexe zerstören. Es ist möglich, daß Monomere gebildet werden, diese aber bei der Gelelektrophorese zerstört werden. Ist der Lhca1 disponibel, kann er durch die Interaktionen, die zur Assemblierung der Untereinheiten führen, die monomere Untereinheit des Lhca4 soweit stabilisieren, daß das Dimer elektrophoretisch auftrennbar wird. Die zweite Annahme erfordert die Formierung des Lhca4-Klons durch den Lhca1, d.h. der Lhca1 unterstützt die Faltung der Lhca4-Mutante, die zunächst nicht korrekt ausgebildet ist, und stabilisiert das Dimer. Ungeachtet der Hypothese ist eine Bildung des Dimeres unabhängig vom Weg der Rekonstitution. Sie funktioniert bei gleichzeitiger Rückfaltung beider Apoproteine in einem Ansatz, aber auch bei nachträglicher Mischung der zuvor einzeln rekonstituierten Monomere.

Die Auftrennung der betroffenen monomeren Komplexe im Saccharosdichtegradienten oder mittels anderer schonender Verfahren könnte zumindest klären helfen, ob die erwähnten Klone vor der elektrophoretischen Auftrennung gefaltet vorliegen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Deletionsmutanten, die im schwach denaturierenden Gel keine Monomerbande bilden, noch eine Monomerbande im Saccharosegradienten liefern. In Abb. 5.3-3 sind die Protein-Pigment-Komplexe der Deletionsmutanten Lhca4 Δ 38N und - Δ 39N als leicht diffuse Monomerbanden zu identifizieren. Die Stabilität beider LHCs ist gegenüber dem Lhca4-Wildtyp reduziert, aber sie sind deutlich als distinkte Bande zu erkennen. Es könnte sein, daß sich auch die Deletionsmutanten Lhca4 Δ 13C - Δ 32C²² sowie die Punktmutanten W39A und W39G des Lhca4 unter weniger denaturierenden Bedingungen als Monomere im Saccharosedichtegradienten auftrennen lassen.

²² Die Deletionsmutanten dieses Bereiches sind der Tabelle 4.3-3 zu entnehmen.

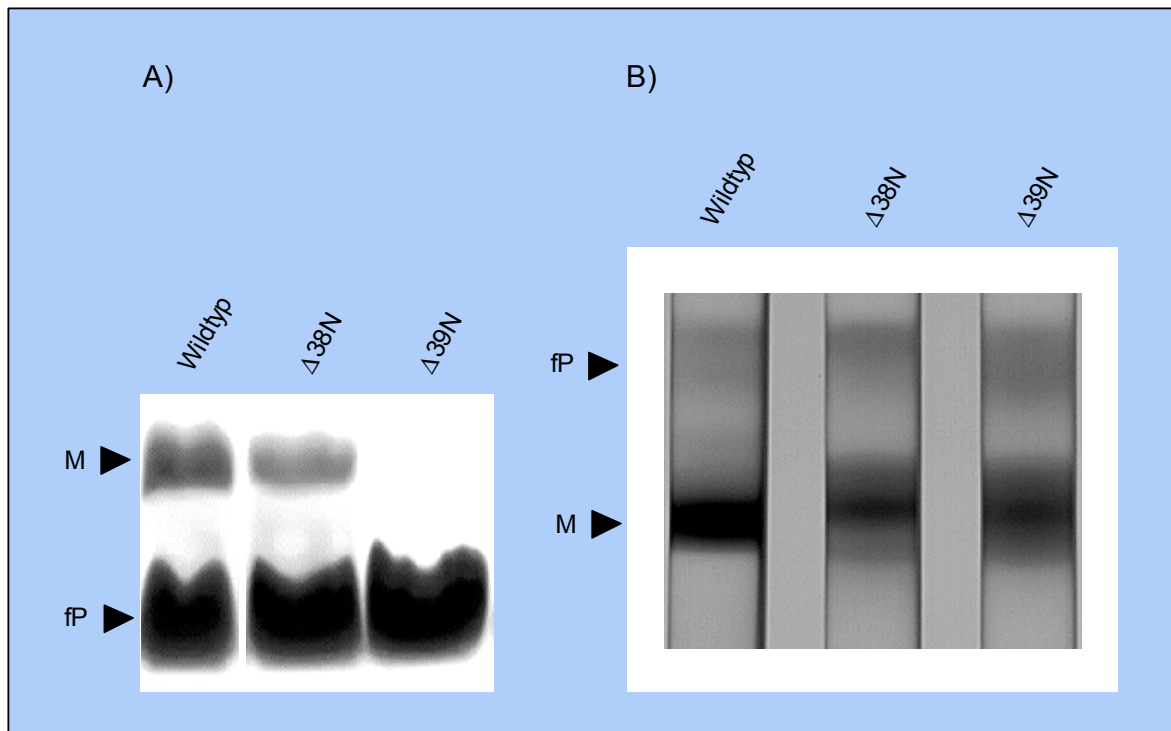


Abb. 5.3-3: Gegenüberstellung der Auftrennungsergebnisse monomerer LHCs mittels A) schwach denaturierender Gelelektrophorese und B) Saccharosedichtegradienten-Ultrazentrifugation am Beispiel vom Wildtyp-Lhca4 und seinen N-terminalen Deletionsmutanten Lhca4 Δ 38N und Δ 39N. Die Mutante Δ 39N bildet keine Monomere mehr, die sich durch das elektrophoretische Verfahren auftrennen lassen. Im Saccharosedichtegradienten ist dagegen eine Monomerbande detektierbar. fP, freies Pigment; M, Monomer.

Daß die Bildung des dimeren LHCI-730 aus einer instabilen Untereinheit nur die Ausnahme ist, beweisen die Ergebnisse der Dimerisierung von Punktmutanten potentiell chlorophyllbindender Aminosäuren (Kap. 5.3.1.4). In allen Fällen sorgte der Aminosäureaustausch beim Ausbleiben der Monomerbildung für eine Unterbindung der Dimerisierung (Tab. 5.3-1). Eine mögliche Erklärung für das Auftreten dieses Phänomens bei nur wenigen Mutanten ist, daß bei den Deletionen oder Aminosäureaustauschen nur Bereiche beeinflußt werden, die die Stabilität des Monomers betreffen und gerade soweit destabilisieren, daß keine Auftrennung im schwach denaturierenden Gelsystem möglich ist. Alle Faktoren, die für eine Assemblierung mit der anderen Untereinheit vorhanden sein müssen, z.B. bestimmte Aminosäuren und ihre exakte Ausrichtung, die korrekte Faltung bestimmter Strukturen, um wechselwirken zu können und Interaktionen nicht zu behindern, usw., sind in diesen Proteinen vorhanden. Sie ermöglichen die stabilisierenden Wechselwirkungen zur Dimerbildung. Letztendlich sagt das Vorhandensein von Protein-Komplexbanden im Gel noch nichts über die Qualität der Produkte aus. Die schonende Gel-Auftrennung erlaubt nur eine kurze Elektrophorese, die es nicht möglich macht, Pigment-Protein-Komplexe hinsichtlich eines geringfügig veränderten Laufverhaltens zu charakterisieren. Diese Tatsache macht eine spektroskopische und biochemische Charakterisierung der Komplexe unerlässlich.

5.3.2 Assemblierungsmotive und Lipidbindung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Termini der LHCI-730-Untereinheiten hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Dimerassemblierung intensiv erforscht. Wie bereits erwähnt, versprachen entsprechende Untersuchungen am LHCI einen guten Ansatz, gleichartige Sachverhalte am LHCI-730 aufklären zu können. Die geringe Homologie in den endständigen extrinsischen Regionen der Apoproteine ließ hier Bereiche bzw. Aminosäuren, die LHCI-730-spezifische Wechselwirkungen vermitteln, vermuten.

Engelman und Mitarbeiter (McKenzie et al., 1997) zeigten am Membranprotein Glycophorin A, daß eine spezifische Homodimerisierung ohne die Beteiligung extrinsischer Proteinabschnitte nur über die Wechselwirkung von Transmembranhelixbereichen erfolgen kann. Durch punktspezifische Aminosäuresubstitutionen identifizierten Lemmon et al. (1994) zuvor ein Dimerisierungsmotiv (LlxxGVxxGVxxT) in der Transmembranhelix für dieses Protein. Russ und Engelman (2000) fanden schließlich in einer Reihe von Transmembranhelices membranständiger Proteine ein allgemeingültiges Motiv mit der Aminosäureabfolge GxxxG.

Diese Sequenz läßt sich für Lhca1 und Lhca4 im Bereich der Transmembranhelices nicht identifizieren. Man findet eine höhere Dichte von Glycinresten vor allem an den potentiellen Kreuzungspunkten der ersten und dritten Transmembranhelix von Lhca1 und Lhca4. Diese spielen aber vermutlich für eine Dimerisierung keine Rolle, da sie für eine Interaktion mit der anderen Untereinheit wahrscheinlich nicht zugänglich sind. Für eine Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten des LHCI-730 erscheint die zweite Transmembranhelix aufgrund ihrer exponierteren Lage am geeignetsten, um mit einer homologen Region der anderen Untereinheit zu interagieren. Tatsächlich besitzt der Lhca1 in der zweiten Transmembranhelix eine dem GxxxG ähnliche Aminosäureabfolge. Das ¹⁰⁶AxxxH-Motiv könnte ein potentieller Interaktionspartner einer ⁹⁹HxxxI-Aminosäureabfolge in der zweiten Helix des Lhca4 sein. In den α - und β -Untereinheiten des LH1 und LH2 der Purpurbakterien wurde bereits die dimerbildende Eigenschaft eines Assemblierungsmotivs aus AxxxH nachgewiesen (Zuber und Cogdell, 1995; Kehoe et al., 1998). Und die Entdeckung einer Isoleucin-Alanin-Wechselwirkung zwischen zwei Helices des bR (Krebs und Isenbarger, 2000) zeigt bereits bekannte Interaktionen zwischen diesen Aminosäuren auf. Weitere Mutationsanalysen in den Transmembranhelices könnten helfen, diesen Sachverhalt zu klären.

Da die Dimerbildung aus Lhca1 und Lhca4 sehr spezifisch ist und weder mit anderen Proteinen der PSI assoziierten Lichtsammlern, noch mit dem Lhcb1 möglich ist (V. Schmid, mündliche Mitteilung), ist die zweite Transmembranhelix mit ihrer geringen Homologie ein möglicher Vermittler spezifischer Interaktionen zwischen den Untereinheiten. Zur Zeit liegen aber nur Daten vor, die aus Aminosäureaustauschen im Lhca4 im Hinblick auf die Auffindung potentieller Chlorophyllbindestellen stammen. Der Wechsel von E-94 nach Serin hatte keinen Einfluß auf die Dimerbildung. Tauschte man E-102 gegen die Aminosäuren Leucin oder Serin aus war die Faltung bzw. Bildung stabiler Monomere nicht möglich und die Dimerbildung blieb ebenfalls aus. Aufgrund der Ergebnisse der N-terminalen Lhca4-Punktmutanten (Kap. 5.3.1.3) kann aber nicht gefolgert werden, daß eine fehlende Monomerbildung immer das Ausbleiben stabiler Dimere bedingt.

In zukünftigen Untersuchungen, die die Bedeutung der zweiten Transmembranhelix klären sollen, ersetzt man am besten diesen Abschnitt durch die gleiche Region eines Proteins, das mit dem Lhca1 oder Lhca4 kein Dimer bildet (Lhca2, Lhca3 oder Lhcb1). Kommt es zum Ausbleiben einer Assemblierung kann man in weiteren Schritten mögliche wechselwirkende Aminosäuren oder Regionen näher eingrenzen und identifizieren.

Wechselwirkungen, die bei der Assemblierung der Untereinheiten des LHCI-730 durch die Transmembranhelices vermittelt werden könnten, scheinen nicht ausreichend für eine stabile Interaktion von Lhca1 und Lhca4 zu sein. Die Unterbindung der Dimerbildungsfähigkeit bei Deletion nur weniger Aminosäuren (Lhca1 Δ 3N) oder bei Aminosäureaustauschen deutet darauf hin.

Die komplexe Struktur des untersuchten Lichtsammlers des PSI legt es nahe, daß Pigmente und hydrophile Proteinabschnitte außerhalb der Membran bei einer spezifischen Assoziierung mit einbezogen werden. Ein im Hinblick auf seine Komplexität dem LHCI-730 ähnliches Protein ist das bR der halophilen Archaea. Krebs et al. (1997) und Isenbarger et al. (1999) untersuchten in Mutationsstudien bR auf dessen Assemblierung über die Transmembranhelices. Sie fanden, daß der größte Teil der Kontaktaufnahme durch van der Waals Wechselwirkungen hydrophober Aminosäuren von Helix B der einen Untereinheit mit Helix D und E einer zweiten Untereinheit vermittelt wird. Messungen der Assoziationskonstanten in den dafür generierten Punktmutanten ergaben allerdings zu geringe Werte, als daß eine alleinige oder hauptsächliche Beteiligung dieser Interaktion für eine Assemblierung ausreichend wäre (Krebs und Isenbarger, 2000). Es konnte aber gezeigt werden, daß Tyrosin-64 auf der extrazellulären Seite im Stande war mit einigen helicalen Aminosäuren durch van der Waals Kräfte zu interagieren. Deren Punktmutante Y64A verursachte Defekte in der Assemblierung der Kristallgitter. Dafür wird eine Beteiligung der Aminosäure am bR - bR-Kontakt diskutiert oder die Lösung einer Lipidbindung verantwortlich gemacht.

Phospholipide, speziell Phosphatidylglycerin (PG), spielen bei der Trimerisierung des LHCII eine essentielle Rolle (Hobe et al., 1995). Man nimmt an, daß ohne PG der trimere LHCII destabilisiert wird (Trémolieres et al., 1994). In Mutagenesestudien von Hobe et al. (1995) wurde am N-Terminus ein Trimerisierungsmotiv identifiziert, ¹⁶WYGPDR²¹, als dessen Funktion unter anderem die Bindung von PG diskutiert wird. Diese Annahme stützen Protease-Verdaus von trimeren LHCs, die nach Deletion von 48 Aminosäuren irreversibel in lipidfreie Monomere zerfielen (Nußberger et al., 1993).

Für die Untereinheiten des LHCI-730 konnte bewiesen werden, daß eine Rekonstitution und Dimerisierung nur in Anwesenheit von Lipiden möglich ist (Schmid et al., 1998). Wechselwirkungen zwischen Protein und Lipiden sind als ein wesentlicher Bestandteil zum Verständnis von Protein-Assemblierungen anzusehen (Weik et al., 1998; Sato et al., 1999) und spielen daher auch bei der Assemblierung zum LHCI-730 eine wichtige Rolle. Eine solche Aminosäureabfolge, die eine Wechselwirkung mit PG eingehen könnte, ist im LHCI-730 bisher nicht gefunden worden.

5.3.3 Zusammenfassung der Diskussion

Die Untereinheiten des LHCI-730, Lhca1 und Lhca4, bilden *in vivo* zumindest temporär monomere Pigment-Protein-Komplexe (Dreyfuss und Thornber, 1994). In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal untersucht, welche N- und C-terminalen Regionen der Apoproteine benötigt werden, um stabile Monomere von Lhca1 und Lhca4 zu bilden. Es konnte gezeigt werden, daß die Monomerstabilität durch Deletion der N-terminalen Schleifen bis zum Beginn der ersten Transmembranhelix unbeeinflusst blieb. Am C-Terminus hat die Entfernung der amphipathischen Helix die Desorganisation der Monomere von Lhca1 und Lhca4 zur Folge, so daß es zu keiner Faltung oder Bildung stabiler LHCs mehr kam. Drei der vier Minimalmutanten der LHCI-730-Untereinheiten zeigen keine Veränderungen in ihrer Fluoreszenzemission. Die Ausnahme bildet Lhca4 Δ 38N, dessen langwelliges Emissionsmaximum deutlich reduziert ist. Als Erklärung bietet sich eine hinreichende Konformationsänderung an, da potentiell chlorophyllbindende Aminosäuren nicht direkt

durch die Deletion betroffen sind. Assembliert diese Mutante mit dem Lhca1-Wildtyp, ist keine Verschiebung im Fluoreszenzemissionspektrum mehr sichtbar, was auf eine korrigierte Faltung des Lhca4 Δ 38N durch den Lhca1 hindeutet.

Abb. 5.3-4 fasst die Ergebnisse der Monomer- und Dimerbildung graphisch zusammen.

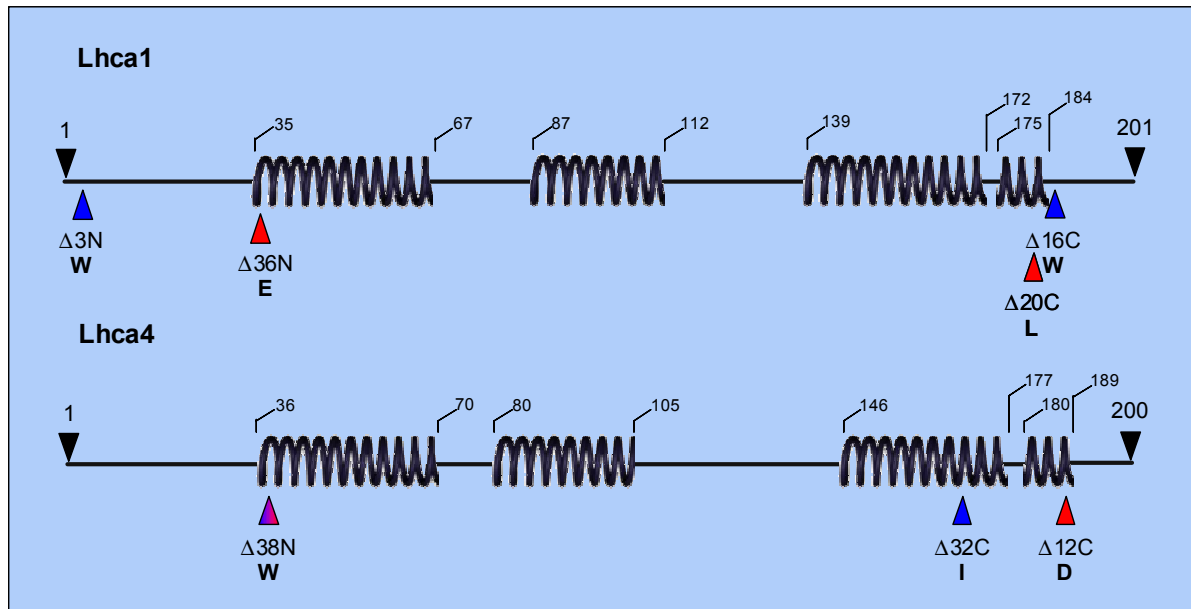


Abb. 5.3-4: Modell der Endpunkte von Monomer- und Dimerbildung des Lhca1 und Lhca4. Die roten Pfeile markieren die Positionen der maximal möglichen Deletionen, die eine Monomerisierung nach gelelektrophoretischer Auftrennung noch erlauben. Die blauen Pfeile kennzeichnen die Aminosäure, bis zu deren Deletion die Dimerbildung noch möglich ist. Die Buchstaben bezeichnen die folgende Aminosäure deren Deletion zum Verlust der Monomer- bzw. Dimer-Bildungsfähigkeit führte. Die Helixgrenzen basieren auf den Daten von Green und Pichersky (1994).

Die Bildung des heterodimeren LHCI-730 aus den beiden Untereinheiten Lhca1 und Lhca4 ist möglicherweise ein einzigartiges Phänomen in der cab-Proteinfamilie. Daher wurden Untersuchungen zur Ermittlung der für die Dimerisierung potentiell relevanten Regionen an den Termini der Dimer-Untereinheiten durchgeführt. Deletionsmutagenese-Experimente ergaben am N-Terminus des Lhca1, daß mit der Deletion der vierten Aminosäure, Tryptophan, keine Dimerbildung mit dem Lhca4-Wildtyp mehr möglich war. Der Austausch von Tryptophan bewies dabei die Bedeutung der hydrophoben Seitenketten-Eigenschaften für die Assemblierung zum Dimer am N-Terminus des Lhca1. Die Proteinverkürzungen am N-Terminus des Lhca4 sowie am C-Terminus des Lhca1 waren beide ebenfalls bis zur Deletion eines Tryptophans möglich (Lhca4 Δ 38N, Lhca1 Δ 16C). Das Ausbleiben stabiler dimerer LHCs ist am N-Terminus des Lhca4 offensichtlich auf die Destabilisierung der Monomere zurückzuführen, die ebenfalls mit der Deletion von 39 Aminosäuren im Gel nicht mehr nachweisbar waren. Aminosäuresubstitutionen hatten dabei einen Effekt auf die Monomerbildung. Die Dimerbildung blieb davon unbeeinflusst, allerdings konnte eine starke Wirkung auf das Fluoreszenzemissionsspektrum nachgewiesen werden. Das Tryptophan am C-Terminus des Lhca1 konnte ohne den Verlust der Dimerbildung ausgetauscht werden, so daß die Funktion der Aminosäure nicht in den spezifischen Eigenschaften ihrer Seitenkette zu vermuten ist. Eine Destabilisierung durch Deletion mehrerer aufeinanderfolgender Aminosäuren weist auf eine Beeinflussung der Dimerbildung hin, die hier nicht nur durch eine

einzig, sondern durch mehrere Aminosäuren bewirkt wird. Die Deletion bis zum W-185 hat erhebliche Effekte auf die Fluoreszenzemission und das CD-Spektrum des Lhca1 Δ 16C, die auf eine Konformationsveränderung hindeuten. Der C-Terminus des Lhca4 nimmt eine Sonderstellung ein, da kein Tryptophan an entscheidender Position liegt und die Bildung stabiler Dimere über den kritischen Bereich der Monomerfaltung hinaus möglich ist. Die Aminosäuresubstitution des I-168 hat keine Wirkung auf die Dimerbildung. Der Lhca1 stabilisiert offenbar die Lhca4-Deletionsmutanten soweit, daß ein im Gel stabiles Dimer gebildet werden kann. Inwieweit dieses Assoziationsprodukt tatsächlich dem nativen Dimer ähnelt ist nicht sicher. Die spektroskopischen Daten sind nahezu identisch mit denen des Wildtyp-Dimers.

5.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, die maximalen N- und C-terminalen Deletionen von Lhca1 und Lhca4, die eine stabile Monomerfaltung der LHCs erlauben, zu bestimmen. Dagegen war die Identifizierung der Endpunkte der Dimerisierung nicht immer eindeutig. An den C-Termini beider Untereinheiten mußten die Minimalmutanten über eine Reihe von Rekonstitutionen und anschließenden Gelaufftrennungen statistisch bestimmt werden. So besteht über die Rolle der C-Termini bei der Dimerisierung noch teilweise Unklarheit. Beide Deletionsmutanten bildeten laut Gelaufftrennung Dimere. Diese Resultate konnten durch weder durch Chlorophyll/Protein-Stöchiometrie-Daten noch durch CD-Absorption und Fluoreszenzemission bestätigt werden. Ein wichtiger Punkt ist die Untersuchung der Protein/Chlorophyll-Verhältnisses. Die Optimierung der Proteinbestimmung wäre hier notwendig, wobei eine Quantifizierung nach Entfernung von Detergentien, Saccharose und Fremdproteinen durchgeführt werden sollte.

Um die Bedeutung der einzelnen Aminosäuren für die Dimerisierung zu ermitteln, müssen die letzten 15 Aminosäuren des C-Terminus am Lhca1 sukzessive mit Hilfe von Aminosäuresubstitutionen untersucht werden, denn hier scheinen mehrere Seitenketten an der Stabilisierung des Dimers beteiligt zu sein. Ein potentieller Kandidat für die Wechselwirkung mit Lhca4 ist vermutlich D-191, das mit W-185 interagieren könnte. Untersuchungen anhand von Einzel- und Doppel-Punktmutanten erscheinen hierfür geeignet.

Durch die Untersuchungen am N-Terminus des Lhca1 konnte gezeigt werden, daß dieser einen wichtigen Faktor für die Dimerisierung darstellt. Leider ist noch nicht klar, ob das Tryptophan, dessen Deletion zum Verlust der Dimerbildung führt, direkt durch eine Wechselwirkung mit dem Lhca4 die Assemblierung der Untereinheiten bewirkt und wo der Interaktionspartner lokalisiert ist. Eine potentielle Wechselwirkung wäre mit dem stromalen Loop des Lhca4 möglich. Erste Versuche in dieser Richtung, in denen der Loop gegen die entsprechende Region des Lhca3 ausgetauscht wurde, lieferten keine stabilen Monomere der Lhca4-Mutanten.

Um zu klären, ob neben Wechselwirkungen der terminalen Regionen auch die Helices die Assemblierung des Dimers bewirken können, könnte in einem ersten Versuch die 2. Helix von Lhca1 und Lhca4 gegen die entsprechende Helix von Lhca2 oder Lhca3, die keine Dimere mit Lhca1 oder Lhca4 bilden, ausgetauscht werden. Hat der Austausch einen Effekt auf die Dimerbildung oder ihre Effizienz, sollten in weiteren Experimenten das AxxxH-Motiv des Lhca1 und die HxxxI-Sequenz des Lhca4 modifiziert werden, um deren Bedeutung für die Assemblierung bewerten zu können.

Eine ausgedehnte Datenbanksuche könnte die Relevanz der oben genannten Motive für andere Transmembranproteine, über den LHCI-730 hinaus, belegen.

6 Zusammenfassung

Proteine setzen sich aus, durch Peptidbindungen kovalent verknüpfte, Aminosäuren zusammen. Die Faltung einer Polypeptidkette ist das Resultat selektiver Interaktionen zwischen den Aminosäureseitenketten einerseits und der physiologischen Umgebung andererseits. Proteine sind an allen biologischen Prozessen beteiligt. Sie steuern und regulieren als Enzyme durch ihre katalytische Aktivität Stoffwechselwege. Proteine transportieren und speichern Stoffe, vermitteln die Umwandlung von chemischer in mechanische Energie, sind maßgeblich an der Reproduktion von Zellen sowie Organismen beteiligt und haben Stütz- und Gerüstfunktion.

Als Träger von Chromophoren sind Proteine unmittelbar an dem Prozeß beteiligt, der Leben in der heutigen Form erst möglich machte, der Photosynthese. Mit Hilfe gebundener (Bakterio)chlorophylle vermitteln Proteine durch die Absorption von Licht letztlich dessen Umwandlung in chemische Energie. Die beteiligten Pigment-Protein-Komplexe der höheren Pflanzen sind in die Thylakoidmembranen der Chloroplasten integriert oder damit assoziiert. Aufgrund der schwierigen Kristallisierung von Membranproteinen ist über die Struktur, der an der Photosynthese beteiligten Proteine noch wenig bekannt. Das Untersuchungsobjekt dieser Arbeit ist der zum Photosystem I gehörende Lichtsampler LHCI-730. Das Molekül ist ein heterodimerer Pigment-Protein-Komplex, bestehend aus den Untereinheiten Lhca1 und Lhca4, der den Licht-Absorptionsquerschnitt des Photosystem I vergrößert. Der LHCI-730 ist wahrscheinlich der einzige heterodimere Lichtsammelkomplex höherer Pflanzen. Eine charakteristische Eigenschaft dieses LHCs ist seine langwellige 77 K Fluoreszenzemission bei 730 nm, die dem Komplex seinen Namen gab. Die für diese Emission verantwortlichen Chlorophylle sind mit der Lhca4-Untereinheit assoziiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe rekombinanter Proteine untersucht, welche terminalen Bereiche der Untereinheiten Lhca1 und Lhca4 für eine Dimerbildung relevant sind. Dabei sollte geklärt werden, ob an den Termini gelegene Aminosäuren für die Dimerisierung essentiell sind. Da die Untereinheiten des LHCI-730 als monomere Pigment-Protein-Komplexe ebenso stabil sind und auch *in vivo* nachgewiesen werden konnten, wurden auch Untersuchungen zu den strukturellen Anforderungen für die Bildung von Lhca1 und Lhca4 Monomeren durchgeführt. Dazu wurden auf DNA-Ebene mittels PCR-Mutagenese Verkürzungen am Protein und Austausch von einzelnen Aminosäuren vorgenommen. Die Mutanten wurden *in vitro* mit Pigmenten rekonstituiert, um deren Bildungsfähigkeit von monomeren und dimeren LHCs durch schwach denaturierende Gelelektrophorese zu bestimmen.

Die Deletionsuntersuchungen zu Identifizierung der für die **Monomerbildung** wichtigen terminalen Bereiche von Lhca1 und Lhca4 zeigten, daß der extrinsische N-terminale Bereich beider Proteine für die Faltung stabiler monomerer Pigment-Protein-Komplexe nicht notwendig ist. Erst mit der Entfernung des E-37 war am N-Terminus des Lhca1 keine Monomerbildung mehr nachweisbar. Die Aminosäure W-39, deren Deletion im Lhca4 zum Verlust der Monomerbildung führte, zeigte beim Austausch gegen die Aminosäuren F, A, G und H im Vollängenprotein, daß in diesem Fall der hydrophobe Charakter der Aminosäure wichtig für die Faltung zum monomeren LHC ist. Die Deletion am C-Terminus der beiden Proteine durfte die amphipathische vierte Helix nicht mit einschließen. Der Lhca1 bildete bis zur Deletion von 20 Aminosäuren Monomere, beim Lhca4 war es möglich das Protein um 12 Aminosäuren zu verkürzen. Es war zu beobachten gewesen, daß die Monomerstabilität mit der Verkürzung der Proteine immer weiter abnahm, ein Effekt, der beim verwandten LHCII nicht nachgewiesen werden konnte. Die Aminosäuren, bei deren Deletion die Monomerbildung an N- und C-Terminus verhindert wurde, waren in ihren Eigenschaften nicht

einheitlich. Es wurden geladene (Glutamat (E-37), Lhca1 N-Terminus und Aspartat (D-188), Lhca4C-Terminus), aromatische (Tryptophan (W-39), Lhca4 N-Terminus) und neutrale Aminosäuren (Leucin (L-181), Lhca1 C-Terminus) an den entscheidenden Positionen identifiziert.

Ähnliche Untersuchungen wurden am monomeren LHCII durchgeführt, von dem seit 1994 eine auf elektronenmikroskopischen Daten beruhende Struktur vorliegt (Kühlbrandt et al., 1994). Der LHCII ist mit Lhca1 und Lhca4 verwandt. Neben einer Sequenzhomologie von ca. 35% sind wichtige strukturbildende Aminosäuren konserviert. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß die Faltung der monomeren LHCs dieser Proteine in den helicalen Bereichen sehr ähnlich ist. Das zeigen auch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, denn die Proteinverkürzungen, die noch eine Monomerbildung erlauben, sind bei den LHCI-730 Proteinen mit denen des LHCII vergleichbar.

Untersuchungen zum Einfluß der Deletionen auf die 77 K Fluoreszenzemission der kürzest möglichen Deletionsmutanten lieferten nur im Fall der N-terminalen Mutante des Lhca4 (Lhca4 Δ 38N) eine Reduzierung der charakteristischen langwelligen Emission bei 725 nm. Dies deutet auf eine Beeinflussung der langwellig emittierenden Chlorophyll-Spezies durch die Deletion des N-Terminus hin.

Die Experimente zur **Dimerbildung** des LHCI-730 lieferten unterschiedliche Ergebnisse für die maximal möglichen Deletionslängen der Termini beider Proteine. Am N-Terminus des Lhca1 war nach Entfernung des Tryptophans an Position 4 keine Dimer-Bande im Gel nachweisbar. In Substitutionsexperimenten war eine Dimerbildung nur bei einem Austausch gegen die ebenfalls aromatische Aminosäure Phenylalanin möglich. Am N-Terminus des Lhca4 bildete die Deletionsmutante mit dem Lhca1-Wildtyp nach Entfernung von 39 Aminosäuren kein Dimer mehr. An dieser Position ist ebenfalls ein Tryptophan der entscheidende Aminosäure-Rest. Da nach Deletion des Tryptophans an der selben Position der Lhca4 keine Monomere mehr bildet, scheint der Verlust der Dimerisierung an dem instabilen/nicht-gefalteten Lhca4 zu liegen, was durch die Ergebnisse der Aminosäure-Substitutionen an dieser Position gestützt wird. Der Austausch von Tryptophan hat hier nur Einfluß auf die Monomerstabilität, nicht aber auf die Dimerbildung. Ein instabiles Monomer verhindert nicht zwangsläufig die Assemblierung der Untereinheiten, wie die Ergebnisse für den C-Terminus des Lhca4 zeigen konnten. Obwohl der monomere Lhca4 nur bis zu einer Deletion von 12 Aminosäuren am C-Terminus stabil ist, bildet er bis zu einer Entfernung von 32 Aminosäuren Dimere. Die Entfernung von Isoleucin an Position 168 (Lhca4 Δ 33C) führt zum Verlust der Dimerbildungsfähigkeit. Der Austausch dieser Aminosäure hat hingegen keinen Effekt auf die Dimerstabilität. Offensichtlich können die mit verkürztem Lhca4 gebildeten LHCs über einen bestimmten Bereich der anderen Untereinheit stabilisiert werden, bis letztendlich der Eingriff in die Proteinfaltung so groß ist, daß das Dimer instabil wird bzw. keine Bildung mehr erfolgen kann. Am C-Terminus des Lhca1 ist wiederum ein Tryptophan die entscheidende Aminosäure. Die Bedeutung der spezifischen Eigenschaften dieser Aminosäure ist an dieser Stelle nicht so essentiell wie am N-Terminus, wie Aminosäureaustausche an dieser Stelle belegen. Die Substitution des Tryptophans durch vier Aminosäuren mit abnehmender Hydrophobizität hat keinen Effekt auf die Bildungsfähigkeit des Dimers.

Ziel dieser Arbeit war es die Relevanz der Termini für die Bildung von Monomer und Dimer zu untersuchen. Die terminalen Strukturen bilden aber sicher nicht die einzigen Bereiche im LHCI-730 bzw. dessen Untereinheiten, die für Faltung, Stabilität und Assemblierung verantwortlich sind. Es konnte am LHCII gezeigt werden, daß bestimmte Aminosäuren in den Schleifenregionen durchaus einen Effekt auf die Stabilität eines monomeren LHCs haben können (Heinemann und Paulsen, 1999). Da die Termini des Lhca4 bei der Dimerbildung

kaum oder gar nicht mit den Termini des Lhca1 zu interagieren scheinen, ist eine Wechselwirkung der Lhca1-Termini mit den Schleifen des Lhca4 denkbar. Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Herstellung von Mutanten eignen sich auch für den Loop-Austausch. Daneben sind die gering konservierten Aminosäuren der zweiten Transmembranhelix, mit einem potentiellen Dimerisierungsmotiv aus hydrophoben Aminosäuren in beiden Untereinheiten mögliche Kandidaten für intermolekulare Wechselwirkungen von Lhca1 und Lhca4.

7 Literatur

A

Anderson, J. M., Andersson, B. (1988) The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion. *Trends Biochem. Sci.* **13**, 351-355

Andersson, B., Styring, S. (1991) Photosystem II: Molecular organization, function and acclimation. *Curr. Topics Bioenerg.* **16**, 1-81

Andersen, B. Koch, B., Scheller, H. V. (1992) Structural and functional analysis of the reducing side of photosystem I. *Physiol. Plant.* **84**, 154-161

Andersen, B., Scheller, H. V., Møller, B. L. (1992) The PSI-E subunit of photosystem I binds ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase. *FEBS Lett.* **311**, 169-173

Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-230

B

Baldwin, R. L., Rose, G. D. (1999) Is protein folding hierarchic? I. Local structure and peptide folding. *Trends in Biochem. Sci.* **24**, 26-33

Bassi, R., Simpson, D. J. (1987) Chlorophyll-protein complexes of barley Photosystem I. *Eur. J. Biochem.* **163**, 221-230

Bassi, R., Dainesse, (1992) A supramolecular light-harvesting complex from chloroplast photosystem-II membranes. *Eur. J. Biochem.* **204**, 317-326

Bassi, R., Croce, R., Cugini, D., Sandonà, 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

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. V. 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

Bogan, A. A., und Thorn, K. S., (1998) Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J. Mol. Biol.* **280**, 1-9

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254

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**, 100-114

Büttner, M., Xie, D. L., Nelson, H., Pinther, W., Hauska, G., Nelson, N. (1992) Photosynthetic reaction center genes in green sulfur bacteria and in photosystem 1 are related. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 8135-8139

Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stueber, D., Mueller, M., Ibrahim, I., Haeuptle, M.-T. and Dobberstein, B. (1987) A T5-promotor-based transcription-translation system for the analysis of protein expression *in vivo* and *in vitro*. Methods Enzymol. **155**, 416-433

Butler, P. J. G., Kühlbrandt, W. (1988) Determination of the aggregate size in detergent solution of the light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex from chloroplast membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 3797-3801

C

Cammarata, K. V., Plumley, F. G., Schmidt, G. W. (1990) in Current research in photosynthesis (Baltschefsky, M., ed.) vol. 2, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, 341-344

Cammarata, K., Schmidt, W. (1992) *In vitro* reconstitution of a light-harvesting gene product: Deletion mutagenesis and analysis of pigment binding. Biochemistry **31**, 2779-2789

Chen, B. and Przybyla, A.E. (1994) An efficient site-directed mutagenesis method based on PCR. BioTechniques **17**, 657-659

Chitnis, V. P., Chitnis, P. R. (1993) PsaL subunit is required for the formation of photosystem I trimers in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. FEBS Lett. **336**, 330-334

Chothia, C. (1974) Hydrophobic bonding and accessible surface area in proteins. Nature **248**, 338-339

Chothia, C., Janin, J. (1975) Principles of protein-protein recognition. Nature **256**, 705-708

Cline, J., Braman, J., Hogrefe, H. (1996) PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. Nucleic Acids Res. **24**, 3546-3551

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., Bassi, R. (1998) The light-harvesting complex of Photosystem I: Pigment composition and stoichiometry. Garab, G. (ed.): Photosynthesis: Mechanisms and Effects, Vol I, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 421-424

Croce, R., Zucchelli, G., Garlaschi, F. M., and Jennings, R. C. (1998) A thermal broadening study of the antenna chlorophylls in PSI-200, LHCl, and PSI core. Biochemistry **37**, 17355-17360

D

Damm, I., Steinmetz, D., Grimme, L., H. (1990) Multiple functions of beta-carotene in Photosystem I. M. Baltschefsky (ed.) Current Research in Photosynthesis, Vol. II, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 607-610

Davis, C. M., Bustamante, P. L., Todd, J. B., Parkes-Loach, P. S., McGlynn, P., Olsen, J. D., McMaster, L., Hunter, C. N. and Loach, P. A. (1997) Evaluation of structure – function relationships in the core light-harvesting complex of photosynthetic bacteria by reconstitution with mutant polypeptides. *Biochemistry* **36**, 3671-3679

de Planque, M. R. R., Boots, J.-W. P., Rijkers, D. T. S., Liskamp, R. M. J., Greathouse, D. V., Killian, J. A. (2002) The effects of hydrophobic mismatch between phosphatidylcholine bilayers and transmembrane α -helical peptides depend on the nature of interfacially exposed aromatic and charged residues. *Biochemistry*, im Druck

Drews, G. (1985) Structure and functional organization of the light-harvesting complexes and photochemical reaction centres in membranes of phototrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* **49**, 59-70

Dreyfuss, B. W. und Thornber, J. P. (1994) Organization of the light-harvesting complex of photosystem I and its assembly during plastid development. *Plant Physiol.* **196**, 841-848

Duquerroy, S., Cherfils, J., Janin, J. (1991) In: Protein Conformation (CIBA Foundation Symposium 161), John Wiley & Sons, Chichester, 237-252

Durnford, D. G., Deane, J. A., Tan, S., McFadden, G. I., Gantt, E., Green, B. R. (1999) A phylogenetic assessment of the eukaryotic light-harvesting antenna proteins, with implications for plastid evolution. *J. Mol. Evol.* **48**, 59-68

E

Engelman, D. M., Deitz, T. A. und Goldman, A. (1986) Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **15**, 321-353

F

Farah, J., Rappaport, F., Choquet, Y., Joliot, P., Rochaix, J. D. (1995) Isolation of a *psaF*-deficient mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*: efficient interaction of plastocyanin with the photosystem I reaction center is mediated by the PsaF subunit. *EMBO J.* **14**, 4976-4984

Fields, S., Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246

Fischer, N., Boudreau, E., Hippler, M., Drepper, F., Haehnel, W., Rochaix, J. D. (1999) A large fraction of PsaF is nonfunctional in photosystem I complexes lacking the PsaJ subunit. *Biochemistry* **38**, 5546-5552

Francke, C., Amesz, J. (1995) The size of the photosynthetic unit in purple bacteria. *Photosynth. Res.* **46**, 347-352

G

Ganeteg, U., Strand, Å., Gustafsson, P. und Jansson, S. (2001) The properties of the chlorophyll *a/b*-binding proteins Lhca2 and Lhca3 studied *in vivo* using antisense inhibition. *Plant Physiology*, **127**, 150-158

Giuffra, E., Cugini, D., Croce, R., Bassi, R. (1996) Reconstitution of pigment-binding properties of recombinant CP29. *Eur. J. Biochem.* **238**, 112-120

Goldberg, M. E. (1985) The second translation of the genetic message: protein folding and assembly. *Trends in Biochem. Sci.* **10**, 388-391

Gounaris, K., Barber, J., Harwood, J. L. (1986) The thylakoid membranes of higher plant chloroplasts. *Biochem. J.* **237**, 313-326

Green, B. R., Pichersky, E. & Klopstech, K. (1991) The chlorophyll *a/b*-binding light-harvesting antennas of green plants: The story of an extend gene family. *TIBS* **16**, 181-186.

Green, B. R. and Pichersky, E. (1994) Hypothesis for the evolution of the 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

Green, B. R. und Durnford, D. G. (1996) The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 685-714

H

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) Down-regulation of the PSI-F Subunit of Photosystem I (PSI) in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **275**, 31211-31218

Halfter, U., Ishitani, M. and Zhu, J-K (2000) The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **97**, 3735-3740

Hartman, F. C., Harpel, M. R. (1994) Structure, function, regulation and assembly of D-ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 197-234

Haworth, P., Watson, J. L., Arntzen, C. J. (1983) The detection, isolation and characterization of light-harvesting complexes which is specifically associated with PSI. *Biochim. Biophys. Acta* **724**, 151-158

Hawthornthwaite, A. M., Cogdell, R. J. (1991) Bacteriochlorophyll-binding proteins. In: Scheer, H. (ed) *The Chlorophylls*, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, USA, 493-528

Heinemann, B. (1999) Random mutations directed to trans-membrane and loop domains of light-harvesting chlorophyll *a/b* protein: Impact on complex formation and pigment binding. Dissertation zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg Universität in Mainz.

Heinemann, B., Paulsen, H. (1999) Random mutations directed to transmembrane and loop domains of the light-harvesting chlorophyll *a/b* protein: Impact on pigment binding. *Biochemistry* **38**, 14088-14093

Heijne, von G. (1986) Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices *EMBO J.* **5**, 1335-1342

Henderson, R., Unwin, P. N. T. (1975). Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature* **257**, 28–32

Hobe, S., Förster, R., Klingler, J. and Paulsen H. (1995) N-proximal sequence motive in light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein is essential for the trimerization of light-harvesting chlorophyll *a/b* complex. *Biochemistry* **34**, 10224-10228

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**, 616-624

I

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**, 103-112

Ingram, V. M. (1957) Gene mutation in human haemoglobin: The chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature* **180**, 326-328

Isenbarger, T. A. und Krebs, M. P. (1999) Role of helix-helix interactions in assembly of the bacteriorhodopsin lattice. *Biochemistry* **38**, 9023-9030

J

Jackowski, G., Pielucha, K. (2001) Heterogeneity of the main light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex of photosystem II (LHCII) at the level of trimeric subunits. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **64**, 45–54

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.

Jaenicke, R. (1998) Protein self-organization *in vitro* and *in vivo*: Partitioning between physical biochemistry and cell biology. *Biol. Chem.* **379**, 237-243

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., Nystrom, 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 in Plant Science* **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

Jones, S and Thornton, J. M. (1995) Protein-protein interactions: A review of protein dimer structures. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **63**, 31-65

K

Karrasch, S., Bullough, P. A. und Ghosh, R. (1995) The 8.5 Å projection map of the light-harvesting complex I from *Rhodospirillum rubrum* reveals a ring composed of 16 subunits. *EMBO J.* **14**, 631-638

Kehoe, J. W., Meadows, K. A., Parkes-Loach, P., Loach, P. A. (1998) Reconstitution of core light-harvesting complexes of photosynthetic bacteria using synthesized polypeptides. 2. Determination of structural features that stabilize complex formation and their implications for the structure of the subunit complex. *Biochemistry* **37**, 3418-3428

Kjaerulff, S., Andersen, B., Nielsen, V. S., Møller, 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**, 18912-18916

Knoetzel, J., Simpson, D. J. (1991) Expression and organisation of antenna proteins in the light- and temperature-sensitive barley mutant chlorina¹⁰⁴. *Planta* **185**, 111-123

Knoetzel, J., Svendsen, I., Simpson, D. J. (1992) Identification of the photosystem I antenna polypeptides in barley. Isolation of three pigment-binding antenna complexes. *Eur. J. Biochem.* **206**, 209-215

Knoetzel, J., Bossmann, B., and 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

Koehne, B., Elli, G., Jennings, R. C., Wilhelm, C., Trissl, H.-W. (1999) Spectroscopic and molecular characterization of long wavelength absorbing antenna of *Ostreobium spec.* *Biochim. Biophys. Acta* **1412**, 94-107

Kosemund, K. (1999) Die Biogenese von Chlorophyll-*a/b*-bindenden Lichtsammelkomplexen: Topographie des Apoproteins bei der Thylakoidinsertion. Dissertation zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg Universität in Mainz.

Krebs, M. P., Li, W., Halambeck, T. P. (1997) Intramembrane substitutions in helix D of bacteriorhodopsin disrupt the purple membrane. *J. Mol. Biol.* **267**, 172-183

Krebs, M. P., Isenbarger, T. A. (2000) Structural determinants of purple membrane assembly. *Biochim. Biophys. Acta* **1460**, 15-26

Kühlbrandt, W., Wang, D N. and Fujiyoshi, Y. (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* **367**, 614-621

Kühlbrandt, W. (1994): Structure and function of the plant light-harvesting complex, LHC-II. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **4**, 519-528

Kuttkat, A., Hartmann, A., Hobe, S. and Paulsen, H. (1996) The C-terminal domain of light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein is involved in the stabilisation of trimeric light-harvesting complex. *Eur. J. Biochem.* **242**, 288-292

Kuttkat, A. (1997) Untersuchungen zur Insertion und Assemblierung des Chlorophyll *a/b*-bindenden Lichtsammelproteins an isolierten Thylakoidmembranen höherer Pflanzen. Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.

L

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685

Lago-Places, E. (2000) Untersuchung der Bedeutung einzelner Aminosäuren für die Chlorophyllbindung und die spektralen Eigenschaften des rekombinanten Lhca4. Diplomarbeit an der biologischen Fakultät der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz

Lam, E., Ortiz, W., Malkin, R. (1984) Chlorophyll *a/b* proteins of Photosystem I. *FEBS Lett.* **168**, 10-14

Landolt-Marticorena, C., Williams, K. A., Deber, C. M., Reithmeier, R. A. F. (1993) Non-random distribution of amino acids in the transmembrane segments of human type I single span membrane proteins. *J. Mol. Biol.* **229**, 602-608

Larsson, U. K., Anderson, J. M., Andersson, B. (1987) Variations in the relative content of the peripheral and inner light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex (LHCII) subpopulations during thylakoid light adaptation and development. *Biochim. Biophys. Acta* **894**, 69-75

Lemmon, M. A., Flanagan, J. M., Hunt, J. F., Adair, B. D., Bormann, B. J., Dempsey, C. E., Engelman, D. M. (1992) Glycophorin A dimerization is driven by specific interactions between transmembrane α -helices. *J. Biol. Chem.* **267**, 7683-7689

Lemmon, M. A., Treutlein, H. R., Adams, P. D., Brünger, A. T., Engelman, D. M. (1994) A dimerization motif for transmembrane α -helices. *Structural Biology* **3**, 157-163

Lemmon, M. A., McKenzie, K. R., Arkin, I. T., Engelman, D. M. (1997) in: G. von Heijne (Ed.), *Membrane protein assembly*, Landes, Austin, TX, USA, 3-23

Liebl, U., Mockensturm-wilson, M., Trost, J. T., Brune, D. C., Blankenship, R. E., Vermaas, W. (1993) Single core polypeptide in the reaction center of the photosynthetic bacterium *Heliobacillus mobilis*: Structural implications and relations to other photosystems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7124-7128

Loach, P. A. und Parkes-Loach, P. S. (1995) in *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (Blankenship, R. E., Madigan, M. T. und Bauer, C. D. Eds.) Chapter 21, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 437-471

Loewenthal, R., Sancho, J., Fersht, A. R. (1992) Histidine-aromatic interactions in barnase. Elevation of histidine pKa and contribution to protein stability. *J. Mol. Biol.* **224**, 759-770

Luecke, H., Schobert, H. T., Richter, J. P., Cartailler, J. K., Lanyi, J. K. (1999) Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **291**, 899-911

Lundberg, K. S., Schoemaker, D. D., Adams, M. W., Short, J. M., Sorge, J. A., Mathur, E. J. (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* **108**, 1-6

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

M

Mason, M. G. and Botella, J. R. (2000) Completing the heterotrimer: Isolation and characterization of an *Arabidopsis thaliana* G protein γ -subunit cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 14784-14788

McDermott, G., Prince, S. M., Freer, A. A., Hawthornthwaite-Lawless, Papiz, A. M., Cogdell, R. J., Isaacs, N. W. (1995) Crystall structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria. *Nature* **374**, 517-521

McGlynn, P., Westerhuis, W.H.J., Jones, M.R., Hunter, C.N. (1996) Consequences for the organization of reaction center-light harvesting antenna 1 (LH1) core complexes of *Rhodobacter sphaeroides* arising from deletion of amino acid residues from the C terminus of the LH1 α polypeptide. *J. Biol. Chem.* **271**, 3285-3292

McKenzie, K. R., Prestegard, J. H., Engelman, D. M. (1997): A transmembrane helix dimer: Structure and implications. *Science* **276**, 131-133

Melkozernov, A. N., Schmid, V. H. R., Schmidt, G. W. and Blankenship, R. E. (1998) Energy redistribution in heterodimeric light-harvesting complex LHCl-730 of photosystem I. *The J. Phys. Chem B*, **102**, 8183-8189

Mitchell, P. (1961) Coupling of photophosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144-148

Morishige, D. T. und Thornber, J. P. (1992) Identification and analysis of a barley cDNA clone encoding the 31-kilodalton LHCIIa (CP29) apoprotein of the light-harvesting antenna complex of photosystem II. *Plant Physiol.* **98**, 238-245

Mosser, G., Breyton, C., Olofsson, A., Popot, J. L., Rigaud, J. L. (1997) Projection map of cytochrome b6/f complex at 8 Å resolution. *J. Biol. Chem.* **272**, 20263-20268

Mukerji, I., Sauer, K. (1993) Energy transfer dynamics of an isolated light-harvesting complex of photosystem I from spinach: Time-resolved fluorescence measurements at 295 K and 77 K. *Biochim. Biophys. Acta* **1142**, 311-320

Murphy, D. J. (1986) The molecular organization of the photosynthetic membranes of higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* **864**, 33-94

N

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

Naver, H., Haldrup, A., Scheller, H. V. (1999) Cosuppression of photosystem I subunit PSI-H in *Arabidopsis thaliana*. J. Biol. Chem. **274**, 10784-10789

Nielsen, V. S., Mant, A., Knoetzel, J., Møller, B. L., Robinson, C. (1994) Import of barley photosystem I subunit N into the thylakoid lumen is mediated by a bipartite presequence lacking an intermediate processing site. Role of the delta pH in translocation across the thylakoid membrane. J. Biol. Chem. **269**, 3762-3766

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.

Nußberger, S., Dörr, K., Wang, D. N. und Kühlbrandt, W. (1993) Lipid-protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex. J. Mol. Biol. **234**, 347-356

O

Oesterhelt, D., Stoekenius, W. (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. Nature New Biology **233**, 149–152

Oesterhelt, D., Tittor, J., Bamberg, E. (1992) A unifying concept for ion translocation by retinal proteins. J. Bioenerg. Biomembr. **24**, 181–191

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

P

Pandini, V., Aliverti, A., Zanetti, G. (1999) Interaction of the Soluble Recombinant PsaD Subunit of Spinach Photosystem I with Ferredoxin I. Biochemistry **38**, 10707-10713

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., Kühlein, N. (1993) Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein. Eur. J. Biochem. **215**, 809-816

Paulsen, H., Kuttkat, A. (1993) Pigment complexes of light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein are stabilized by a segment in the carboxy-terminal hydrophilic domain of the protein. Photochem. Photobiol. **62**, 367-382

Pichersky, E., Subramaniam, R., White, M. J., Reid, J., Aebersold, R. und Green, B. R. (1991) Chlorophyll a/b-binding (CAB) polypeptides of CP29, the internal chlorophyll a/b complex of photosystem II: Characterization of the tomato gene encoding the 26 kDa (type I) polypeptide, and evidence for a second CP29 polypeptide. Mol. Gen. Genet. **227**, 277-284

Pichersky, E. und Jansson, S. (1996) The light-harvesting chlorophyll a/b-binding polypeptides and their genes in angiosperm and gymnosperm species. Oxygenic Photosynthesis: The light reactions. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 507-521

Plumley, F. G., Schmidt, G. W. (1987) Reconstitution of chlorophyll *a/b* light-harvesting complexes: xanthophyll-dependent assembly and energy transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 146-150

Popot, J.-L., Engelman, D. M. (1990) Membrane protein folding and oligomerization: The two-stage model. Biochemistry **29**, 4031-4037

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

R

Rautenberg, D. (2001) Analyse der Chlorophyllbindung durch Rekonstitution des punktmutierten Lichtsammelproteins Lhca4. Diplomarbeit an der biologischen Fakultät der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz

Remelli, R., Varatto, C., Sandonà, D., Croce, R., Bassi, R. (1999) Chlorophyll binding to monomeric light-harvesting complex. J. Biol. Chem. **274**, 33510-33521

Rhee, K. H., Morriss, E. P., Barber, J., Kühlbrandt, W. (1998) Three-dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8 Å resolution. Nature **396**, 283-286

Richter, P., Cortez, N., Drews, G. (1991) Possible role of the highly conserved amino acids Trp-8 and Pro-13 in the N-terminal segment of the pigment-binding polypeptide LHI α of *Rhodobacter capsulatus*. FEBS Lett. **285**, 80-84

Richter, P., Brand, M., and Drews, G. (1992) Characterization of LHI⁻ and LHI⁺ *Rhodobacter capsulatus pufA* mutants. J. Bacteriol. **174**, 3030-3041

Rogl, H., Kühlbrandt, W. (1999) Mutant trimers of light-harvesting complex II exhibit altered pigment content and spectroscopic features. Biochemistry **38**, 16214-16222

Rupprecht, J., Paulsen, H., Schmid, V. H. R. (2000) Protein domains required for formation of stable monomeric Lhca1- and Lhca4-complexes. Photosynth. Res. **63**, 217-224

Russ, W. P., Engelman, D. M. (2000): The GxxxG motif: A framework for transmembrane helix-helix association. J. Mol. Biol. **296**, 911-919

S

Sancho, J., Serrano, L., Fersht, A. R. (1992) Histidine residues at the N- and C-termini of α -helices: perturbed pK_as and protein stability. Biochemistry **31**, 2253-2258

Santini, C., Tidu, V., Tognon, G., Ghirelli Magaldi, A., Bassi, R. (1994) Three-dimensional structure of the higher-plant photosystem II reaction centre and evidence for its dimeric organisation *in vivo*. Eur. J. Biochem. **221**, 307-315

Sato, H., Takeda, K., Tani, K., Hino, T., Okada, T., Nakasako, M., Kamiya, N., Kouyama, T. (1999) Specific lipid-protein interactions in a novel honeycomb lattice structure of bacteriorhodopsin. Acta Crystallogr. D **55**, 1251-1256

- 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
- Schiffer, M., Chang, C.-H., Stevens, F. J. (1992) The functions of tryptophan residues in membrane proteins. *Protein Engineering* **5** (3), 213-214
- Schmid, V. H. R., Schäfer, C. (1994) Alterations of the chlorophyll-protein 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 LHCl-730: Heterodimerization is required for antenna pigment organisation. *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., ed.), Vol. I., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 425-428
- Schmid, V. H. R., Thomé, P., Rühle, W., Paulsen, H., Kühlbrandt, W., Rogl, H. (2001) Chlorophyll *b* is involved in long-wavelength spectral properties of light-harvesting complexes LHCl and LHCII. *FEBS Lett.* **499**, 27-31
- Schwartz, E., Pichersky, E. (1990) Sequence of two tomato nuclear genes encoding chlorophyll *a/b*-binding proteins CP24, a PSII antenna component. *Plant Mol. Biol.* **15**, 157-160
- Schweikardt, T. (2001) 3-D Modellierung von Sequenzen auf der Basis von Röntgenstrukturen. Diplomarbeit an der biologischen Fakultät der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz
- Sengchanthalangsy, L. L., Datta, S., Huang, D.-B., Anderson, E., Braswell, E. H., Ghosh, G. (1999) Characterization of the dimer interface of transcription factor NFκB p50 homodimer. *J. Mol. Biol.* **289**, 1029-1040
- Sieferman-Harms, D. (1985) Carotenoids in photosynthesis. I. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function. *Biochim. Biophys. Acta* **811**, 325-355
- Smith, P. K. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85
- Sorensen, K., Brodbeck, U. (1986) A sensitive protein assay using microtiter[®] plates. *J. Immunol. Meth.* **95**, 291-293
- 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
- Stites, W. E. (1997) Protein-Protein interactions: interface structure, binding thermodynamics, and mutational analysis. *Chem. Rev.* **97**, 1233-1250
- Sturgis, J., Robert, B. (1994) Thermodynamics of membrane polypeptide oligomerization in light-harvesting complexes and associated structural changes. *J. Mol. Biol.* **238**, 445-454

T

Tan, S., Cunningham, F. X.; Gantt, E. (1997) *LhcaR1* of the red alga *Porphyridium cruentum* encodes a polypeptide of the LHCI complex with seven potential chlorophyll *a*-binding residues that are conserved in most LHCs. *Plant Mol. Biol.* **33**, 157-167

Thomé, P. (2000) Mutagenese potentieller Chlorophyllbindungsstellen: Effekt auf die Chlorophyllbindung und die spektralen Eigenschaften von LHCI. Diplomarbeit an der biologischen Fakultät der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz

Tjus, S. E., Roobol-Boza, M., Pålsson, L.-O., Andersson, B. (1995) Rapid isolation of Photosystem I chlorophyll-binding proteins by anion exchange perfusion chromatography. *Photosynth. Res.* **45**, 41-49

Trémolieres, A., Dainese, P., Bassi, R. (1994) Heterogenous lipid distribution among chlorophyll-binding proteins of photosystem II in maize mesophyll chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* **221**, 721-730

Trissl, H. W. (1993) Long-wavelength absorbing antenna pigments and heterogeneous absorption bands concentrate excitons and increase absorption cross section. *Photosynth. Res.* **35**, 247-263

V

van Thor, J. J., Geerlings, T. H., Matthijs, H. P., Hellingwerf, K. J. (1999) Kinetic evidence for the *psaE*-dependent transient ternary complex Photosystem I/Ferredoxin/Ferredoxin:NADP⁺ reductase in a Cyanobacterium. *Biochemistry*, **38**, 12735-12746

Venter, J. C. et al. (2001) The Sequence of the Human Genome. *Science* **291**, 1304-1351

W

Watowich, S. J., Gross, L. J., Josephs, R. (1993) Analysis of the intermolecular contacts within sickle hemoglobin fibers: Effect of the site-specific substitutions, fiber pitch, and double-strand disorder. *J. Struct. Biol.* **111**, 161-179

Weik, M., Patzelt, H., Zaccai, G., Oesterhelt, D. (1998) Localization of glycolipids in membranes by *in vivo* labeling and neutron diffraction. *Mol. Cell* **1**, 411-419

Weber, J. Senior, A. E. (1997) Catalytic mechanism of F₁-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **1319**, 19-58

Wiener, M. (2000) Überexpression und *in vitro* Rekonstitution des Photosystem I-Lichtsammelkomplexes Lhca2. Diplomarbeit an der biologischen Fakultät der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz

X

Xu, Q., Hoppe, D., Chitnis, V. P., Odom, W. R., Guikema, J. A., Chitnis, P. R. (1995) Mutational analysis of photosystem I polypeptides of the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **270**, 16243-16250

Y

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

Yau, W.-M., Wimley, W. C., Gawrisch, K. and White, S. H. (1998) The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry* **37**, 14713-14718

Yu, J. et al. (2002) A draft sequence of the Rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* **296**, 79-92

Z

Zuber, H.; Brunisholz, R. A. (1991) Structure and function of antenna polypeptides and chlorophyll-protein complexes: Principles and variability. In: *The Chlorophylls* (Scheer, H., ed). CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, USA, 627-703

Zuber und Cogdell (1995) Structure and organization of purple bacterial antenna complexes. In: *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (Blankenship, R. E., Madigan, M. T. und Bauer, C. D., eds.), Chapter 21, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 315-348

Allgemeine Lehrbücher und Manuals

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J. (1995) *Short protocols in molecular biology*, Third edition, John Wiley & Sons, Inc.

Häder, D.-P. (1999) *Photosynthese*. 1. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Hobe, S. und Paulsen, H. (1998) *Praktikumsskript, Botanisches Praktikum für Fortgeschrittene II*, Universität Mainz

Richter, G. (1988) *Stoffwechselphysiologie der Pflanzen: Physiologie und Biochemie des Primär- und Sekundärstoffwechsels*. 5. überarbeitete und erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Sambrook, K., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, New York, USA

Schrattenholz, A. (2001) *Methoden der Proteomforschung. Molekulare Analyse der Proteinexpression*. André Schrattenholz (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer Heidelberg, Berlin

Stryer, L. (1994) *Biochemie*. 2. korrigierter Nachdruck, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford

Taiz, L. und Zeiger, E. (2000) *Physiologie der Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin

Voet, D., Voet, J. G. (1992) *Biochemie*. Wiley-VCH Weinheim

Anhang

A.1 Primer

In den folgenden Tabellen sind die Primer, die zur Herstellung von Deletions- und Punktmutanten verwendet wurden, aufgelistet. Alle Primer sind in 5`-3`-Richtung notiert.

Primer zur Herstellung der Deletionsmutanten:

Tab. A.1-1: Auflistung der zur Herstellung der Deletionsmutanten verwendeten Primer. Die violette Unterlegung kennzeichnet den Teil des Primers, der nicht homolog zur Originalsequenz ist. Die blaue Markierung bezeichnet das Kodon der Restriktionsenzyme *BamH I* (gga tcc) und *Hind III* (aag ctt). Gelb unterlegt sind die zur Originalsequenz homologen Abschnitte, die als einzige zur Berechnung der Annealing-Temperatur herangezogen wurden.

Lhca1, N-Terminus:

Klon	Primer	Deletierte Sequenz
cab6	cab6cdf (forward): 5` ... tg agg gga tcc atg tca gct gat tgg atg cc ... 3` cab6ndr (reverse): 5` ... a tag aag ctt tta att agg gaa aat gcc ttt ag ... 3`	
cab6Δ3N	cab6nd3f: 5` ... tg tca gga tcc tgg atg ccc ggg cag cc ... 3` cab6ndr: 5` ... a tag aag ctt tta att agg gaa aat gcc ttt ag ... 3`	SAD
cab6Δ4N	cab6cd4f: 5` ... ca gct gga tcc atg ccc ggg cag ccc c ... 3` cab6ndr: 5` ... a tag aag ctt tta att agg gaa aat gcc ttt ag ... 3`	SADW
cab11Δ5N	cab6nd5f: 5` ... ct gat gga tcc ccc ggg cag ccc cgt c ... 3` cab6ndr: 5` ... a tag aag ctt (tta) att agg gaa aat gcc ttt ag ... 3`	SADWM
cab6Δ10N	cab6nd10f: 5` ... gg cag gga tcc cca tct tac ctc gac ggc ... 3` cab6ndr: 5` ... a tag aag ctt (tta) att agg gaa aat gcc ttt ag ... 3`	SADWMPGQPR
cab6Δ34N	cab6nd34f: 5` ... aa gta gga tcc aat ttg gaa aga tac aaa gaa tct ... 3` cab6ndr: 5` ... a tag aag ctt tta att agg gaa aat gcc ttt ag ... 3`	SADWMPGQPRPS YLDGSAPGDFGFD PLGLGEVPA
cab6Δ36N	cab6ndf: 5` ... ct gca gga tcc gaa aga tac aaa gaa tct gaa c ... 3` cab6ndr: 5` ... a tag aag ctt tta att agg gaa aat gcc ttt ag ... 3`	SADWMPGQPRPS YLDGSAPGDFGFD PLGLGEVPANL

cab6Δ37N	cab6nd37f: 5` ... ca aat gga tcc aga tac aaa gaa tct gaa ctt att ... 3` cab6ndr: 5` ... a tag aag ctt (tta) att agg gaa aat gcc ttt ag ... 3`	SADWMPGQPRPS YLDGSAPGDFGFD PLGLGEVPANLE
cab6Δ38N	cab6nd38f: 5` ... at ttg gga tcc tac aaa gaa tct gaa ctt att cat ... 3` cab6ndr: 5` ... a tag aag ctt (tta) att agg gaa aat gcc ttt ag ... 3`	SADWMPGQPRPS YLDGSAPGDFGFD PLGLGEVPANLER

Lhca1, C-Terminus:

Klon	Primer	Deletierte Sequenz
cab6	cab6cdf (forward): 5` ... tg agg gga tcc atg tca gct gat tgg atg cc ... 3` cab6ndr (reverse): 5` ... a tag aag ctt tta att agg gaa aat gcc ttt ag ... 3`	
cab6Δ8C	cab6cdf: 5` ... tg agg gga tcc atg tca gct gat tgg atg cc ... 3` cab6cd194r: 5` ... t gcc aag ctt (tta) aat aac atc ccc aat gtt gtt g ...3`	IPKGIFPN
cab6Δ9C	cab6cdf: 5` ... tg agg gga tcc atg tca gct gat tgg atg cc ... 3` cab6cd193r: 5` ... c ttt aag ctt (tta) aac atc ccc aat gtt gtt gtg...3`	IIPKGIFPN
cab6Δ10C	cab6cdf: 5` ... tg agg gga tcc atg tca gct gat tgg atg cc ... 3` cab6cd192r: 5` ... t agg aag ctt (tta) atc ccc aat gtt gtt gtg cc...3`	VIIPKGIFPN
cab6Δ11C	cab6cdf: 5` ... tg agg gga tcc atg tca gct gat tgg atg cc ... 3` cab6cd191r: 5` ... g gat aag ctt (tta) ccc aat gtt gtt gtg cca tg ...3`	DVIIPKGIFPN
cab6Δ12C	cab6cdf: 5` ... tg agg gga tcc atg tca gct gat tgg atg cc ... 3` cab6cd190r: 5` ... t aat aag ctt (tta) aat gtt gtt gtg cca tgg gt ...3`	GDVIIPKGIFPN
cab6Δ13C	cab6cdf: 5` ... tg agg gga tcc atg tca gct gat tgg atg cc ... 3` cab6cd189r: 5` ... t aat aag ctt (tta) gtt gtt gtg cca tgg gtc a ...3`	IGDVIIPKGIFPN
cab6Δ14C	cab6cdf: 5` ... tg agg gga tcc atg tca gct gat tgg atg cc ... 3` cab6cd188r: 5` ... c atc aag ctt (tta) gtt gtg cca tgg gtc agc ...3`	NIGDVIIPKGIFPN
cab6Δ15C	cab6cdf: 5` ... tg agg gga tcc atg tca gct gat tgg atg cc ... 3` cab6cd187r: 5` ... c aat aag ctt (tta) gtg cca tgg gtc agc caa ...3`	NNIGDVIIPKGIFPN

cab6Δ16C	cab6cdf: 5` ... tg agg gga tcc atg tca gct gat tgg atg cc ... 3` cab6cd186r: 5` ... c aat aag ctt (tta) cca tgg gtc agc caa gtg ...3`	HNNIGDVIIIPKGIFP N
cab6Δ17C	cab6cdf: 5` ... tg agg gga tcc atg tca gct gat tgg atg cc ... 3` cab6cd185r: 5` ... t gtt aag ctt (tta) tgg gtc agc caa gtg agt t ...3`	WHNNIGDVIIIPKGIF PN
cab6Δ18C	cab6cdf: 5` ... tg agg gga tcc atg tca gct gat tgg atg cc ... 3` cab6cd184r: 5` ... t gtt aag ctt (tta) gtc agc caa gtg agt tgc c ...3`	PWHNNIGDVIIIPKGI FPN
cab6Δ19C	cab6cdf: 5` ... tg agg gga tcc atg tca gct gat tgg atg cc ... 3` cab6cd183r: 5` ... t gtg aag ctt (tta) agc caa gtg agt tgc caa g ...3`	DPWHNNIGDVIIIPK GIFPN
cab6Δ20C	cab6cdf: 5` ... tg agg gga tcc atg tca gct gat tgg atg cc ... 3` cab6cd182r: 5` ... g cca aag ctt (tta) caa gtg agt tgc caa gtt ct ...3`	ADPWHNNIGDVIIIP KGIFPN
cab6Δ21C	cab6cdf: 5` ... tg agg gga tcc atg tca gct gat tgg atg cc ... 3` cab6cd181r: 5` ... a tgg aag ctt (tta) gtg agt tgc caa gtt ctc c ...3`	LADPWHNNIGDVII PKGIFPN
cab6Δ22C	cab6cdf: 5` ... tg agg gga tcc atg tca gct gat tgg atg cc ... 3` cab6cd180r: 5` ... g gtc aag ctt (tta) agt tgc caa gtt ctc caa tg ...3`	HLADPWHNNIGDVI IPKGIFPN
cab6Δ29C	cab6cdf: 5` ... tg agg gga tcc atg tca gct gat tgg atg cc ... 3` cab6cdr: 5` ... a gtt aag ctt (tta) tcc tgt tcc tgg ata tgc tg ... 3`	PLENLATHLADPW HNNIGDVIIIPKGIFP N

Lhca4, N-Terminus:

Klon	Primer	Deletierte Sequenz
cab11	cab11cdf (forward): 5` ... ta agc gga tcc aag aaa ggt caa tgg ctt cc ... cab11ndr (reverse): 5` ... a att aag ctt cta gtt gct gag tgt ttg ga ... 3`	
cab11Δ11N	cab11nd11f (forward): 5` ... gc tta gga tcc cct gat tat ctt gat ggc ag ... 3` cab11ndr (reverse): 5` ... a att aag ctt cta gtt gct gag tgt ttg ga ... 3`	KKGQWLPLGLAS
cab11Δ24N	cab11nd24f (forward): 5` ... ga gac gga tcc ttt gat cca ttg gga ctt gtg ... 3` cab11ndr (reverse): 5` ... a att aag ctt cta gtt gct gag tgt ttg ga ... 3`	KKGQWLPLGLASPD YLDGSLPGDNG

cab11Δ32N	cab11nd32f: 5` ... ga ctt gga tcc gac cca gag aac ttg aaa tg ... 3` cab11ndr: 5` ... a att aag ctt cta gtt gct gag tgt ttg ga ... 3`	KKGQWLPGLASPD YLDGSLPGDNGFD PLGLVE
cab11Δ35N	cab11nd35f: 5` ... tg gag gga tcc aac ttg aaa tgg ttc atc cag ... 3` cab11ndr: 5` ... a att aag ctt cta gtt gct gag tgt ttg ga ... 3`	KKGQWLPGLASPD YLDGSLPGDNGFD PLGLVEDPE
cab11Δ37N	cab11ndf (forward): 5` ... ca gag gga tcc aaa tgg ttc atc cag gct ga ... 3` cab11ndr (reverse): 5` ... a att aag ctt cta gtt gct gag tgt ttg ga ... 3`	KKGQWLPGLASPD YLDGSLPGDNGFD PLGLVEDPENL
cab11Δ38N	cab11nd38f: 5` ... ag aac gga tcc tgg ttc atc cag gct gaa c ... 3` cab11ndr: 5` ... a att aag ctt cta gtt gct gag tgt ttg ga ... 3`	KKGQWLPGLASPD YLDGSLPGDNGFD PLGLVEDPENLK
cab11Δ39N	cab11nd39f: 5` ... ac ttg gga tcc ttc atc cag gct gaa ctg g ... 3` cab11ndr: 5` ... a att aag ctt cta gtt gct gag tgt ttg ga ... 3`	KKGQWLPGLASPD YLDGSLPGDNGFD PLGLVEDPENLKW
cab11Δ40N	cab11nd40f: 5` ... tg aaa gga tcc atc cag gct gaa ctg gtg a ... 3` cab11ndr: 5` ... a att aag ctt cta gtt gct gag tgt ttg ga ... 3`	KKGQWLPGLASPD YLDGSLPGDNGFD PLGLVEDPENLKW F
cab11Δ42N	cab11nd42f: 5` ... gg ttc gga tcc gct gaa ctg gtg aat ggt c ... 3` cab11ndr: 5` ... a att aag ctt cta gtt gct gag tgt ttg ga ... 3`	KKGQWLPGLASPD YLDGSLPGDNGFD PLGLVEDPENLKW FIQ

Lhca4, C-Terminus:

Klon	Primer	Deletierte Sequenz
cab11	cab11cdf (forward): 5` ... ta agc gga tcc aag aaa ggt caa tgg ctt cc ... cab11ndr (reverse): 5` ... a att aag ctt cta gtt gct gag tgt ttg ga ... 3`	
cab11Δ10C	cab11cdf: 5` ... ta agc gga tcc aag aaa ggt caa tgg ctt cc ... cab11cd191r: 5` ... t gat aag ctt (tta) cca tgg gtc aga gag gtg ... 3`	HNTIIPKGFIPN
cab11Δ11C	cab11cdf: 5` ... ta agc gga tcc aag aaa ggt caa tgg ctt cc ... 3` cab11cd190r: 5` ... t ggt aag ctt (tta) tgg gtc aga gag gtg ctg ... 3`	WHNTIIPKGFIPN
cab11Δ12C	cab11cdf: 5` ... ta agc gga tcc aag aaa ggt caa tgg ctt cc ... 3` cab11cd189r: 5` ... t gtg aag ctt (tta) gtc aga gag gtg ctg cag ... 3`	PWHNTIIQTLN

cab11Δ13C	cab11cdf: 5` ... ta agc gga tcc aag aaa ggt caa tgg ctt cc ... 3` cab11cd188r: 5` ... g cca aag ctt (tta) aga gag gtg ctg cag aag g ... 3`	DPWHNTIIQTLN
cab11Δ14C	cab11cdf: 5` ... ta agc gga tcc aag aaa ggt caa tgg ctt cc ... 3` cab11cd187r: 5` ... g cca aag ctt (tta) gag gtg ctg cag aag gtt g ... 3`	SDPWHNTIIQTLN
cab11Δ15C	cab11cdf: 5` ... ta agc gga tcc aag aaa ggt caa tgg ctt cc ... 3` cab11cd186r: 5` ... a tgg aag ctt (tta) gtg ctg cag aag gtt gtc a ... 3`	LSDPWHNTIIQTLN
cab11Δ16C	cab11cdf: 5` ... ta agc gga tcc aag aaa ggt caa tgg ctt cc ... 3` cab11cd185r: 5` ... g gtc aag ctt (tta) ctg cag aag gtt gtc aaa ag... 3`	HLSDPWHNTIIQTLN
cab11Δ20C	cab11cdf: 5` ... ta agc gga tcc aag aaa ggt caa tgg ctt cc ... 3` cab11cd181r: 5` ... g ctg aag ctt (tta) gtc aaa agg tcc ctt ccc ... 3`	NLLQHLSDPWHNTIIQTLN
cab11Δ21C	cab11cdf: 5` ... ta agc gga tcc aag aaa ggt caa tgg ctt cc ... 3` cab11cd180r: 5` ... g cag aag ctt (tta) aaa agg tcc ctt ccc agt c... 3`	DNLLQHLSDPWHNTIIQTLN
cab11Δ22C	cab11cdf: 5` ... ta agc gga tcc aag aaa ggt caa tgg ctt cc ... 3` cab11cd179r: 5` ... g aag aag ctt (tta) agg tcc ctt ccc agt cac ... 3`	FDNLLQHLSDPWHNTIIQTLN
cab11Δ23C	cab11cdf: 5` ... ta agc gga tcc aag aaa ggt caa tgg ctt cc ... 3` cab11cd178r: 5` ... g gtt aag ctt (tta) tcc ctt ccc agt cac att g ... 3`	PFDNLLQHLSDPWHNTIIQTLN
cab11Δ24C	cab11cdf: 5` ... ta agc gga tcc aag aaa ggt caa tgg ctt cc ... 3` cab11cd177r: 5` ... t gtc aag ctt (tta) ctt ccc agt cac att gtg c... 3`	GPFDNLLQHLSDPWHNTIIQTLN
cab11Δ25C	cab11cdf: 5` ... ta agc gga tcc aag aaa ggt caa tgg ctt cc ... 3` cab11cdr: 5` ... g gtt aag ctt (tta) tcc ctt ccc agt cac att g ... 3`	KGPFDNLLQHLSDPWHNTIIQTLN
cab11Δ26C	cab11cdf: 5` ... ta agc gga tcc aag aaa ggt caa tgg ctt cc ... 3` cab11cd175r: 5` ... a agg aag ctt (tta) agt cac att gtg ctg cac tat ... 3`	GKGPFDNLLQHLSDPWHNTIIQTLN
cab11Δ27C	cab11cdf: 5` ... ta agc gga tcc aag aaa ggt caa tgg ctt cc ... 3` cab11cd174r: 5` ... g tcc aag ctt (tta) cac att gtg ctg cac tat aa ... 3`	TGKGPFDNLLQHLSDPWHNTIIQTLN

cab11Δ28C	cab11cdf: 5` ... ta agc gga tcc aag aaa ggt caa tgg ctt cc ... 3` cab11cd173r: 5` ... c ctt aag ctt (tta) att gtg ctg cac tat aaa tcc ... 3`	VTGKGPFDNLLQH LSDPWHNTIIQTLS N
cab11Δ29C	cab11cdf: 5` ... ta agc gga tcc aag aaa ggt caa tgg ctt cc ... 3` cab11cd172r: 5` ... t ccc aag ctt (tta) gtg ctg cac tat aaa tcc ca ... 3`	NVTGKGPFDNLLQ HLSDPWHNTIIQTL SN
cab11Δ32C	cab11cdf: 5` ... ta agc gga tcc aag aaa ggt caa tgg ctt cc ... 3` cab11cd169r: 5` ... c aat aag ctt (tta) tat aaa tcc caa aaa tgc caa c ... 3`	VQHNVTGKGPFDN LLQHLSDPWHNTII QTLSN
cab11Δ33C	cab11cdf: 5` ... ta agc gga tcc aag aaa ggt caa tgg ctt cc ... 3` cab11cd168r: 5` ... t gtg aag ctt (tta) aaa tcc caa aaa tgc caa cat a .. 3`	IVQHNVTGKGPF NLLQHLSDPWHNTI IQTLSN
cab11Δ34C	cab11cdf: 5` ... ta agc gga tcc aag aaa ggt caa tgg ctt cc ... 3` cab11cd167r: 5` ... g ctg aag ctt (tta) tcc caa aaa tgc caa cat agc ... 3`	FIVQHNVTGKGPF NLLQHLSDPWHNTI IQTLSN
cab11Δ35C	cab11cdf: 5` ... ta agc gga tcc aag aaa ggt caa tgg ctt cc ... 3` cab11cd166r: 5` ... g cac aag ctt (tta) caa aaa tgc caa cat agc c ... 3`	GFIVQHNVTGKGF DNLLQHLSDPWHN TIIQTLSN
cab11Δ38C	cab11cdf: 5` ... ta agc gga tcc aag aaa ggt caa tgg ctt cc ... 3` cab11cd163r: 5` ... a tcc aag ctt (tta) caa cat agc caa tct ccc ... 3`	AFLGFIVQHNVTGK GPFDNLLQHLSDP WHNTIIQTLSN

Primer zur Herstellung der Punktmutanten:

Tab. A.1-2: Forward-Primer zur Herstellung der **N-terminalen Punktmutanten des Lhca1**. Gleichzeitig mit der Veränderung des Kodons für die neue Aminosäure (gelb unterlegt) wurde die in der Nähe liegende *Pvu II*-Schnittstelle (CAGCTG, grün markiert) gelöscht. Als Reverse-Primer wurde cab6ndr verwendet (Sequenz s. Tab. A-1). Fett gedruckte Buchstaben wurden bei der Berechnung der Annealing-Temperatur der Primer nicht berücksichtigt, da sie zur Originalsequenz nicht homolog sind.

Klon	Primer
Lhca1	atg tca gct gat ttg atg ccc gg
Lhca1W4F	atg tca gcc gat ttc atg ccc g
Lhca1W4A	atg tca gcc gat gcg atg ccc g
Lhca1W4G	atg tca gcc gat ggg atg ccc g
Lhca1W4H	atg tca gcc gat cac atg ccc gg

Tab. A.1-3: Forward-Primer zur Herstellung der **C-terminalen Punktmutanten des Lhca1**. Durch den Basenaustausch für den Einbau der neuen Aminosäure wurde gleichzeitig die an dieser Position liegende *Nco I*-Schnittstelle (CCA TGG) gelöscht. Als Reverse-Primer wurde cab6ndr verwendet. Fett gedruckte Buchstaben wurden bei der Berechnung der Annealing-Temperatur der Primer nicht berücksichtigt.

Klon	Primer
Lhca1	g gct gac cca tgg cac aac aac
Lhca1W185F	g gct gac cca ttc cac aac aac
Lhca1W185A	gct gac cca gcg cac aac aac
Lhca1W185G	g gct gac cca cac cac aac aac
Lhca1W185H	ct gac cca ggg cac aac aac

Tab. A.1-4: Reverse-Primer zur Herstellung **N-terminaler Punktmutanten des Lhca4**. Durch Ersetzen der Base Cytosin am Ende des Kodon gegen Thymidin wurde die *Xmn I*-Schnittstelle (GAANNNTTC, grün unterlegt) gelöscht. Gelb markiert ist das Kodon für die ausgetauschte Aminosäure. Als Forward-Primer wurde cab11cdf verwendet. Fett gedruckte Buchstaben wurden bei der Berechnung der Annealing-Temperatur der Primer nicht berücksichtigt.

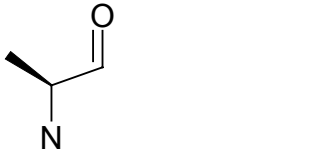
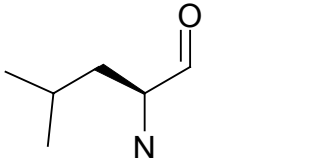
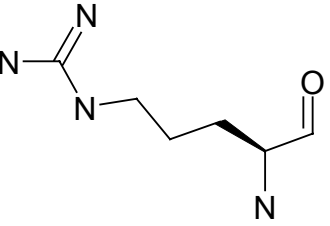
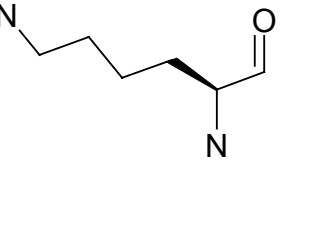
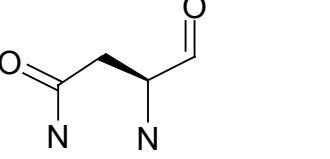
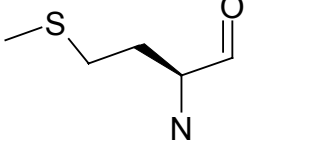
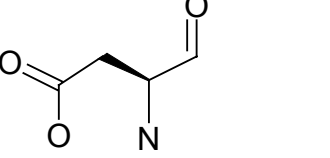
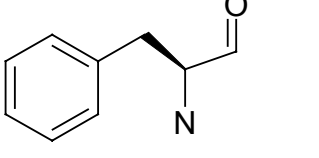
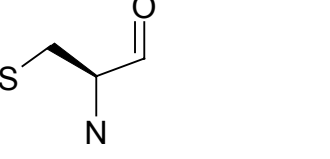
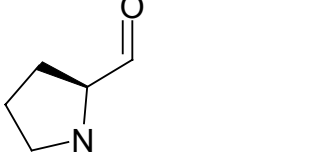
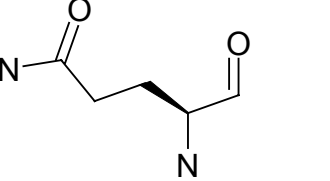
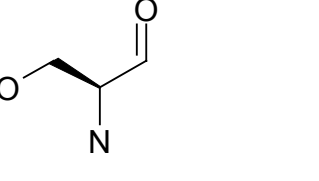
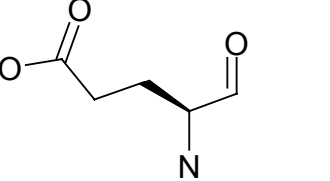
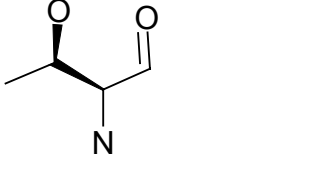

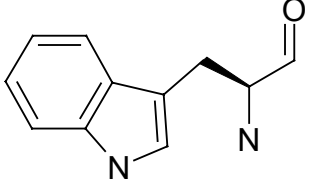
Klon	Primer
Lhca4	gc ctg gat gaa ggt ttt caa gtt ct
Lhca4W39F	gc ctg gat gaa gaa ttt taa gtt ct
Lhca4W39A	gc ctg gat gaa cgc ttt taa gtt ctc
Lhca4W39G	gc ctg gat gaa ccc ttt taa gtt ctc
Lhca4W39H	gc ctg gat gaa gtg ttt taa gtt ct

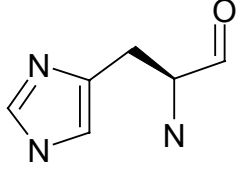
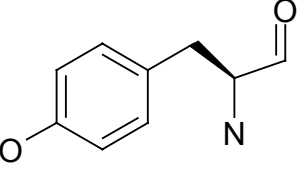
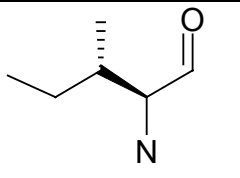
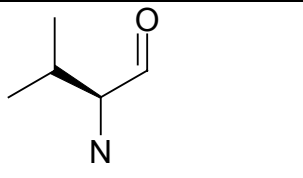
Tab. A.1-5: Reverse-Primer zur Herstellung **C-terminaler Punktmutanten des Lhca4**. Durch Ersetzen der Base Cytosin am Anfang des Kodon gegen Thymidin wurde die *Dra III*-Schnittstelle (CAC NNN GTG, grün unterlegt) gelöscht. Als Reverse-Primer wurde cab11ndr verwendet.

Klon	Primer
Lhca4	tg gga ttt ata gtg cag cac aat gtg ac
Lhca4I168W	tg gga ttt tgg gtg cag cat aat gtg ac
Lhca4I168F	tg gga ttt ttc gtg cag cat aat gtg ac
Lhca4I168L	tg gga ttt tta gtg cag cat aat gtg ac
Lhca4I168A	tg gga ttt gca gtg cag cat aat gtg ac
Lhca4I168H	tg gga ttt gtg gtg cag gtg ac

A.3 Aminosäuren

Tab. A.3-1: Aminosäureseitenketten, Strukturen und Abkürzungen.

Alanin (A)		Leucin (L)	
Arginin (R)		Lysin (K)	
Asparagin (N)		Methionin (M)	
Aspartat (D)		Phenylalanin (F)	
Cystein (C)		Prolin (P)	
Glutamin (Q)		Serin (S)	
Glutamat (E)		Threonin (T)	
Glycin (G)		Tryptophan (W)	

Histidin (H)	 <p>Chemical structure of Histidine (H): A five-membered imidazole ring is attached to a side chain consisting of a methylene group and a chiral center bonded to an amino group and a carboxyl group.</p>	Tyrosin (Y)	 <p>Chemical structure of Tyrosine (Y): A benzene ring with a hydroxyl group at the para position is attached to a side chain consisting of a methylene group and a chiral center bonded to an amino group and a carboxyl group.</p>
Isoleucin (I)	 <p>Chemical structure of Isoleucine (I): A side chain consisting of a chiral center bonded to a methyl group and an ethyl group, and another chiral center bonded to an amino group and a carboxyl group.</p>	Valin (V)	 <p>Chemical structure of Valine (V): A side chain consisting of a chiral center bonded to two methyl groups and another chiral center bonded to an amino group and a carboxyl group.</p>

Lebenslauf

Zur Person

Name: Jens Rupprecht

Geburtstag: 25.02.1969

Geburtsort: Iserlohn

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Kind: Alena Rupprecht (12.09.1999)

Anschrift: Schwanenstr. 83
64297 Darmstadt

Schulen

1975 bis 1979 Schillerschule, Lahnstein

1979 bis 1985 Johannes-Gymnasium, Lahnstein

1985 bis 1989 Staatlichen Gymnasium, Lahnstein
Abschluß Abitur

Universitätsausbildung

Februar 1991 bis März 1998 Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

August 1994 Diplom-Vorprüfung
Gesamtnote: gut

April 1997 Diplom-Hauptprüfung
Gesamtnote: sehr gut

Mai 1997 bis März 1998 Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Botanik bei Prof. Dr. Harald Paulsen.

Titel der Arbeit: „Bindung von Chlorophyll-Derivaten und rekombinanten Lichtsammler-Komplexen als Lichtfänger an einen Halbleiter: Bau einer „grünen“ Solarzelle.“

Note: sehr gut

Seit April 1998 Promotion am Institut für Allgemeine Botanik

bei Prof. Dr. Harald Paulsen unter Betreuung von Dr. Volkmar Schmid.

Titel der Arbeit: „Bedeutung N- und C-terminaler Aminosäuren für die Monomer- und Dimerbildung von Lichtsammelproteinen des Photosystem I.“

Wissenschaftliche Beschäftigung

Juni 1998 bis Mai 2001

Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Labor von Dr. V. Schmid am Institut für Allgemeine Botanik der Johannes Gutenberg Universität, Mainz

Publikationen

Rupprecht, J., Paulsen, H., Schmid, V. H. R. (2000) Protein domains required for formation of stable monomeric Lhca1- and Lhca4-complexes. *Photosynth. Res.* **63**, 217-224

Schmid, V. H. R., Paulsen, H., Rupprecht, J. (2002) 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*, im Druck