

**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

Kirstin Kosemund
geb. in Biedenkopf

Mainz, 1999

Dekan: Prof. Dr. J. Markl

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Dezember 1999

1	Einleitung	1
1.1	Die Photosynthese	1
1.1.1	Die Lichtsammelproteine höherer Pflanzen	1
1.1.2	Das LHCII-Strukturmodell	2
1.2	Die Zielsteuerung kerncodierter Chloroplasten-Proteine	5
1.2.1	Der Import kerncodierter Proteine über den allgemeinen Translokationskomplex	6
1.2.2	Zielsteuerung von Proteinen innerhalb des Chloroplasten	8
1.2.2.1	Sec- und Δ pH abhängige Protein-Translokation	8
1.2.2.2	Spontane Insertion in Thylakoide	10
1.2.2.3	Der SRP-abhängige Transport von Lhcb1 und anderen integralen Membran-Proteinen	11
1.3	Zielsetzung der Arbeit	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Konstruktion Hexahistidyl-markierter (p)LHCP-Klone	17
2.1.1	Anzucht von Bakterien	19
2.1.2	Plasmid-Isolation aus Bakterien	19
2.1.2.1	Plasmid-Isolation nach He	19
2.1.2.2	Plasmid-Isolation mit Alkali/SDS-Lyse und Anionen-Austauscher-Säulen	20
2.1.3	Fällung von DNA	21
2.1.4	Ortsgerichtete Mutagenese	21
2.1.5	Agarose-Gelelektrophorese	23
2.1.6	DNA-Konzentrationsbestimmung über Absorptionsmessung	25
2.1.7	Restriktion von DNA	25
2.1.8	Agarose-Gel-Extraktion	26
2.1.9	Dephosphorylierung geschnittener Plasmide mit CIP	26
2.1.10	Phosphorylierung von DNA-Enden mit Polynukleotidkinase	27
2.1.11	Ligation von Inserts und Vektoren	27
2.1.12	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA	28
2.1.12.1	Herstellung kompetenter Bakterienzellen nach Mike Scott	28
2.1.12.2	Transformation	29
2.2	Proteinchemische Arbeiten	30
2.2.1	Isolation von Einschlusskörpern aus Bakterien	30
2.2.2	Proteinbestimmung	32
2.2.3	Diskontinuierliche SDS-PAGE	32
2.2.4	Coomassie-Färbung	34
2.2.5	Silberfärbung	35
2.2.6	Western-Blot und Nachweis His ₆ -markierter Proteine	36
2.2.6.1	Ponceau S Färbung	37

2.2.6.2	Nachweis Hexahistidyl-markierter Proteine	37
2.2.6.2.1	Ni-NTA-AP-Konjugat-Reaktion	38
2.2.6.2.2	Anti-RGSHIS-Antikörper-Reaktion	39
2.2.6.3	BCIP/NBT-Reaktion.....	41
2.2.7	Rekonstitution von LHCII	42
2.3	Radioaktive Markierung von Einschlußkörpern mit [³⁵S]Methionin	43
2.3.1	Kulturbedingungen	43
2.3.1.1	Isolation der Einschlußkörper	46
2.3.1.2	Autoradiographie	46
2.3.1.3	Fluorometrie.....	46
2.3.1.4	Aktivitätsbestimmung im Szintillationszähler.....	47
2.4	Isolation von Chloroplasten, Stroma und Thylakoiden aus jungen Erbsen-	
	blättern.....	47
2.4.1	Pflanzenanzucht	47
2.4.2	Chloroplasten-Isolation.....	47
2.4.3	Isolation von Stromaprotein und Thylakoiden	49
2.4.4	Bestimmung von Stromaprotein	49
2.4.5	Bestimmung des Chlorophyllgehalts von Chloroplasten und Thylakoiden	50
2.5	Insertion von überexprimiertem (p)LHCP in isolierte Thylakoide	50
2.5.1	Proteinvorbereitung	50
2.5.2	Insertion	50
2.5.2.1	Proteaseverdau nach Insertion	51
2.5.3	Gelelektrophoresen	51
2.5.3.1	Denaturierendes Laemmli-Gel.....	52
2.5.3.2	Schwach denaturierendes Laemmli-Gel	52
2.6	Bindung rekombinanter (His)₆-Lichtsammlerproteine an Magnetpartikel.....	53
2.6.1	Elementanalyse mit dem Atom-Absorptions-Spektrometer (AAS)	54
2.6.2	Bindung und Elution Hexahistidyl-markierter Lhcb1-Derivate	55
3	Ergebnisse.....	57
3.1	Konstruktion Hexahistidyl-markierter Lhcb1-Derivate.....	57
3.2	Rekonstitution Hexahistidyl-markierter Lhcb1-Derivate	60
3.3	Bindung Hexahistidyl-markierter Lhcb1-Derivate an Magnetpartikel	63
3.3.1	Bestimmung der Ni ²⁺ -Bindekapazität für paramagnetische Dextranpartikel	64
3.3.2	Bindung Hexahistidyl-markierter Lhcb1-Derivate an paramagnetische Partikel	65
3.3.3	Bindesepezifität von Magnetpartikeln in Stromaextrakt	68
3.3.4	Magnetpartikel-gebundenes His6-Lhcb1 unter Insertionsbedingungen	69

3.4	Insertion Hexahistidyl-markierter Lhcb1-Derivate in isolierte Erbsen-thylakoide	71
3.5	Insertion von Lhca1 in isolierte Erbsenthylakoide.....	83
3.6	Insertion von Chlorophyll-Liganden-Mutanten in isolierte Erbsen-thylakoide	90
4	Diskussion.....	92
4.1	Die Hexahistidyl-Verlängerung von Lhcb1 als Affinitäts-Markierung.....	92
4.1.1	Die "His-Tag"-Position im Lhcb1 des beeinflusst die Nachweisreaktion	92
4.1.2	Chloroplastenproteine binden unspezifisch an Metall-beladene Magnetpartikel.....	93
4.2	Ein "His-Tag" im Lhcb1 behindert nicht die in-vitro-Rekonstitution von LHCII-Monomeren	97
4.3	Topographische Aspekte zur Insertion von "His-Tag"-Lhcb1 in isolierte Erbsenthylakoide	99
4.3.1	Lhcb1 inseriert in Form einer Schleifen-Struktur in Thylakoide	101
4.3.2	Ein "His-Tag" am C-Terminus von Lhcb1 setzt die Insertions-Effizienz herab.....	103
4.3.3	Eine N-terminaler "His-Tag" am Lhcb1 stört nicht die Thylakoidinsertion.....	106
4.3.4	Der Elektronenakzeptor Methylviologen kann das Insertionssystem nicht stabilisieren	107
4.4	"His-Tag"-Lhcb1 im Chloroplastenstroma neigt zur Aggregation	108
4.4.1	Die Hemmung der Insertion durch Octylglycosid.....	109
4.4.2	Metallionen führen zur Aggregation von "His-Tag"-Lhcb1.....	109
4.5	Mutationen an bestimmten Positionen im Lhcb1 hemmen die Trimerisierung.....	111
4.5.1	Ein "His-Tag" N-proximal der ersten MDB hemmt die Trimerisierung von LHCII.....	111
4.5.2	Mutationen in den Chlorophyll-Liganden Histidin ⁶⁸ und Glutamat ¹³¹ hemmen die Trimerisierung von LHCII aus unterschiedlichen Gründen	111
4.6	Untersuchungen zur LHCI-Biogenese	113
4.6.1	LHCI-730 in Thylakoiden wird von Thermolysin nicht degradiert	112
4.6.2	Lhca1 aus Tomate wird in das Erbsensystem inseriert, in das Tomaten-system dagegen nur schlecht.....	114
5.	Zusammenfassung.....	116
6.	Literaturverzeichnis.....	118
7.	Anhang.....	131
8.	Abkürzungsverzeichnis.....	133

1 Einleitung

1.1 Die Photosynthese

Ein fundamentaler Prozeß für das Leben auf der Erde ist die Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie. Bei diesem als Photosynthese bezeichneten Biosyntheseweg werden organische oder anorganische Verbindungen unter Absorption von Lichtenergie oxidiert und die Elektronen zur Reduktion von CO_2 verwendet. Die Elektronen stammen bei der Photosynthese von Algen, höheren Pflanzen und Cyanobakterien aus Wasser, das in einer Lichtreaktion photolytisch gespalten wird. Da im Zuge dieser Reaktion neben Elektronen molekularer Sauerstoff freigesetzt wird, wird sie als oxygene Photosynthese bezeichnet. Für diesen Prozeß sind Licht absorbierende Chromophore notwendig, die so angeordnet sein müssen, daß eine effektive Absorption und Weiterleitung der Lichtenergie gewährleistet sind. Die oben genannten Organismen erfüllen diese Voraussetzung mit Hilfe zweier Photosysteme (PSI und PSII), welche die Lichtabsorption mit dem Elektronenfluß in der Thylakoidmembran koppeln. Jedes Photosystem besteht aus einem peripheren Antennenkomplex (Lichtsammelkomplex, LHC), und einem Kernkomplex mit dem Reaktionszentrum (RZ). Die Absorption von Lichtquanten findet in den Antennenkomplexen statt, welche die Energie zu den Reaktionszentren weiterleiten. Dort erfolgt die photoinduzierte Wasserspaltung. Im Prinzip ist das RZ alleine in der Lage die photochemischen Primärprozesse ohne die Antennen auszuführen. Da das RZ jedoch nur wenige Licht absorbierende Chromophore aufweist, wäre die Umsatzrate so klein, daß die Lichtenergie nicht effizient genutzt werden könnte. Durch die Antennensysteme wird der Absorptionsquerschnitt erhöht und die photochemische Umsetzung optimal. Antennen verfügen weiterhin über Mechanismen, die den Energietransfer im Zuge wechselnder Lichtbedingungen regulieren und damit die Reaktionszentren vor einer Überanregung und Schädigung schützen.

Lichtsammelsysteme sind in allen photoautotrophen Organismen anzutreffen. Diese unterscheiden sich zum Teil erheblich voneinander. Die Unterschiede liegen in der Architektur der Pigment-Protein Komplexe und der damit verbundenen Art und Weise Lichtenergie weiterzuleiten und den Energiefluß zu regulieren. Hauptschwerpunkte dieser Arbeit sind Untersuchungen zur Biogenese Chlorophyll-*a/b*-bindender Antennenproteine (*cab*-Proteine) in höheren Pflanzen. Im folgenden werden diese kurz skizziert.

1.1.1 Die Lichtsammelproteine höherer Pflanzen

Bei höheren Pflanzen und Grünalgen lassen sich drei Typen Chlorophyll-*a/b*-bindender Lichtsammelproteine voneinander unterscheiden: minore Antennenkomplexe, der majore Antennenkomplex LHCII und schließlich der Antennenkomplex LHCI (Bassi et al., 1997; Jansson, 1994). Die minoren Antennenkomplexe CP24 (Lhcb6), CP26 (Lhcb5) und CP29 (Lhcb4), sind mit PSII assoziiert, so auch der majore Antennenkomplex LHCII, an dessen Bildung die Apoproteine Lhcb1 und Lhcb2 beteiligt sind. Dieser Lichtsammelkomplex macht etwa ein Drittel des Gesamtproteins in den Thylakoiden aus und bindet zirka die Hälfte des in der Pflanze vorkommenden Chlorophylls. Ob auch das Protein Lhcb3 Teil des LHCII ist, konnte noch nicht definitiv geklärt werden (Jansson, 1994). LHCII kann, im Gegensatz zu den

minoren Antennen, als mobile Antenne fungieren. Im Zuge einer Kurzzeit-Regulation wird LHCII bei hohen Lichtintensitäten redoxreguliert phosphoryliert, koppelt von PSII in den Grana-Thylakoiden ab und migriert in die Stroma-Thylakoide, wo der Komplex an PSI bindet (Allen, 1995). Dies dient einer optimalen Energieverteilung auf beide Photosysteme. PSI bindet außerdem eigene Lichtsammelkomplexe (LHCI), die sich aus LHCI-730 (Lhca1 und Lhca4) sowie LHCI-680 (Lhca2 und Lhca3) zusammensetzen (Jansson, 1994, Schmid *et al.*, 1997).

1.1.2 Das LHCII-Strukturmodell

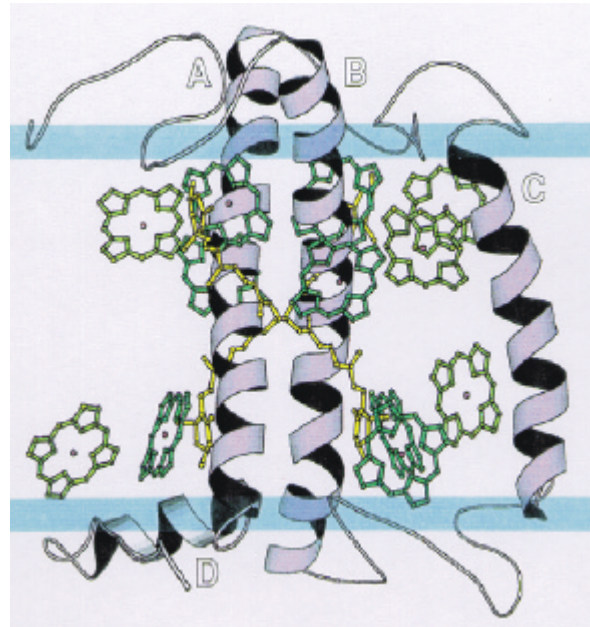


Abbildung 1.1.2-1 Die dreidimensionale Struktur von LHCII nach Kühlbrandt *et al.*, 1994. Der hier als Monomer dargestellte Pigment-Protein Komplex durchspannt die Thylakoidmembran (begrenzt durch die hellblauen Balken) mit drei hydrophoben α -Helices (A, B und C). Der obere Bereich ragt in das Chloroplastenstroma, der untere Bereich und die amphipatische Helix D in das Thylakoidlumen. Die grünen Tetrapyrrol-Symbole stellen die Chlorophylle dar. Obwohl die Auflösung der Struktur nicht ausreichend war, um Chl a von Chl b zu unterscheiden, wurden die möglichen Positionen dieser Pigmente in hellgrün (Chl b) und dunkelgrün (Chl a) abgebildet (siehe Text). In der Mitte sind zwei sich überkreuzende Xanthophylle lokalisiert (gelb dargestellt).

Alle Untereinheiten dieser drei Antennentypen gehören einer Familie eng verwandter Proteine mit Molekulargewichten zwischen 20-28 kDa an. Diese Proteine weisen in manchen Sequenzabschnitten hohe Homologien auf. Hauptgemeinsamkeit sind drei α -helikale Abschnitte, die die Thylakoidmembran in spezifischer Struktur durchspannen. Das Modell einer dreidimensionalen Struktur wurde mittels Elektronenmikroskopie (EM) von 2-D-Kristallen des LHCII mit einer Auflösung von 3,4 Å aufgestellt. (Kühlbrandt *et al.*, 1994). Dieses Strukturmodell gilt auch als Modell für die Faltung aller anderen Mitglieder der *cab*-Familie (Abbildung 1.1.2-1). Für die nicht-kovalent gebundenen Pigmente wurden acht Aminosäuren als Chlorophyll-Liganden identifiziert (His, Gln, Asn, Glu/Arg). Wegen der geringen Unterschiede zwischen Chl *a* und *b* konnten deren Positionen im LHCII nicht ermittelt werden. Sie wurden aufgrund ihrer spektralen Eigenschaften so in das Modell eingepaßt, daß ein Energietransfer von Chl *b* nach Chl *a* über geringe Abstände (Van-der-Waals-Kontakt) möglich ist und alle Chl *a* in der Nähe der Xanthophylle positioniert sind. Der Grund

für diese Zuordnung ist, daß Xanthophylle in der Lage sind Chl-Triplett-Anregungen zu löschen, was vor allem für Chl *a* gefordert werden muß (Eads *et al.*, 1989; Pålsson *et al.*, 1994).

Trotz ihrer Homologie und der charakteristischen Organisation weisen die einzelnen Antennen auch Unterschiede auf. Dies betrifft sowohl ihre Pigmentbindenden Eigenschaften, als auch ihren Oligomerisierungszustand in der Thylakoidmembran (Tabelle 1.1.2-1):

Komplex	Chl/M	Chl <i>a/b</i>	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Aggregation	Ref.
LHCII	12	1,4	7	5	Trimer	a
CP24	10	1	5	5	Monomer	b
CP26	9	2	6	3	Monomer	b
CP29	8	3	6	2	Monomer	c
LHCI _(nativ)	10	4	8	2	Dimer	d
LHCI-730 _(rek.)	7	2,5	5	2	Dimer	e

Tabelle 1.1.2-1 Pigmentbindung und Oligomerisierungszustand der Lichtsammelkomplexe Chl = Chlorophyll; M = Monomer; rek = rekonstituiert; a = Kühlbrandt *et al.*, 1994; b= Sandoná *et al.*, 1998; c= Bassi *et al.*, 1999; d= Schmid *et al.*, 1997; e = Croce und Bassi, 1998

LHCII bindet neben Chl drei Xanthophylle. Zwei Lutein, etwa ein Neoxanthin und weniger als ein Violaxanthin pro monomerem LHCII wurden identifiziert (Peter und Thornber, 1991; Lee und Thornber, 1995). Stöchiometrische Untersuchungen an CP sowie LHCI sprechen für eine Bindung von nur zwei Xanthophyllen (Pesaresi *et al.*, 1997; Giuffra *et al.*, 1997; Connelly *et al.*, 1997; Schmid *et al.*, 1997; Croce und Bassi, 1998). Da die tatsächlichen Positionen von Chl *a* und Chl *b*, sowie die dritte Xanthophyllbindestelle mit den derzeitigen strukturanalytischen Methoden nicht identifizierbar sind, versuchen verschiedene Arbeitsgruppen den Weg über die biochemische Analysen nativer oder *in vitro* gefalteter Lichtsammelproteine zu gehen. Die Arbeit mit *in vitro* gefalteten Komplexen wurde durch die Entwicklung einer Methode möglich, mit der in Bakterien überexprimiertes Lichtsammelprotein in Detergens-Mizellen zu Pigment-Protein Komplexen rekonstituiert werden kann (Plumley und Schmidt, 1987; Paulsen *et al.*, 1993). Dies eröffnete die Möglichkeit mannigfaltiger Manipulationen an den Lichtsammelproteinen. Zum Beispiel wurden einzelne, als Pigmentbindende Liganden identifizierte Aminosäuren durch andere Aminosäuren ersetzt und die Faltungsprodukte auf ihre Pigment-Komposition hin untersucht (Yang *et al.*, 1999, Rogl und Kühlbrandt, 1999, Croce *et al.*, 1999 *a* und *b*; Bassi *et al.*, 1999; Remelli *et al.*, 1999). Es zeigte sich, daß die Mutation eines Chl-Liganden in LHCII weitere Chl-Bindestellen beeinflusste, was die eindeutige Zuordnung eines einzelnen Chl zu einem Chl-Liganden schwierig machte. Nur eine Bindestelle, Glutamin¹³¹ (*b6*), scheint tatsächlich präferentiell Chl *b* zu binden. Zwar konnten alle Mutanten *in vitro* LHCII bilden, jedoch hatten die verschiedenen Mutationen unterschiedliche Auswirkungen auf die Stabilität der Komplexe. (Yang *et al.*, 1999). In einer weiteren Arbeit mit *in vitro* trimerisierten LHCII-Mutanten konnten dagegen die von Kühlbrandt und seinen Mitarbeitern 1994 vorgeschlagenen Chl-Liganden *a1*, *a2*, *a3*, *b5* und *b6* bestätigt werden. Die in diesem Modell vermutete Chl *b3*-Bindestelle scheint jedoch eine Chl *a*-Bindestelle zu sein. Die Position von Chl *a2* kommt aufgrund der ermittelten spektralen Charakteristiken als das energieärmste und damit wahrscheinlich als das Chl in Frage, das die Energie zum RZ weiterleitet (Rogl und

Kühlbrandt, 1999). Die dritte Xanthophyllbindestelle in LHCII wurde anhand von Mutantenanalysen als Neoxanthinbindestelle in den LHCII positioniert (Croce *et al.*, 1999).

Ebenfalls wurde durch *in vitro*-Faltungsexperimente aufgedeckt, daß die Bindung von Pigmenten eine Voraussetzung für die Faltung von Lhcb1 (Paulsen *et al.*, 1993). Für eine Pigment-abhängige Stabilisierung des LHCII *in vivo* spricht, daß Pflanzen, die aufgrund einer Beleuchtung mit kurzen Lichtintervallen (intermittent light, IML) nur wenig Chl *b* bilden, nicht in der Lage sind LHCII zu akkumulieren (Day *et al.*, 1984; Tzinas *et al.*, 1987; Jahns und Junge, 1993). Zusätzliche Erkenntnisse wurden durch Insertionsexperimente mit in Bakterien überexprimiertem Lhcb1 gewonnen. Auch hier konnte gezeigt werden, daß die stabile Integration von Lhcb1 in die Thylakoide sehr eng mit der Bindung von Pigment gekoppelt ist: In Gersten-Etioplasten kann überexprimiertes Lhcb1 nicht stabil eingebaut werden. Erst wenn der Reaktionsansatz mit den Chlorophyll-Vorstufen Zn-Pheophorbid *a/b* und Geranylgeraniolpyrophosphat supplementiert wurde, konnte Protease-resistentes Lhcb1 in den Membranen nachgewiesen werden (Kuttkat *et al.*, 1997).

In der Thylakoidmembran liegt LHCII vor allem als Trimer vor. Der trimere Oligomerisierungszustand scheint die funktionelle Form dieses Antennenkomplexes zu sein (Butler und Kühlbrandt, 1988), wobei die Anteile von Homo- oder Heterotrimeren nicht bekannt sind. Trimer-stabilisierende Motive wurden im LHCII am N- und am C-Terminus gefunden (Paulsen und Kuttkat, 1993; Kuttkat *et al.*, 1996; Hobe *et al.*, 1995). Interessant ist, daß eine trimere Organisation bei den anderen Lichtsammelproteinen nicht gefunden wird. Während LHCI Dimere bildet (Jansson *et al.*, 1996; Schmid *et al.*, 1997), liegen die minoren Antennen als monomere Komplexe vor (Bassi und Dainese, 1992). Versuche, die Stöchiometrie der Antennenproteine in Bezug auf die Photosysteme zu bestimmen, führte zu verschiedenen Modellen der Antennen-Organisation von PSI und PSII (Jansson, 1994; Jansson *et al.*, 1996). Die monomeren minoren Antennen liegen möglicherweise in einer 1:1 Stöchiometrie pro PSII-RZ vor (Bassi *et al.*, 1997). Vor kurzem veröffentlichte elektronenmikroskopische (EM) Analysen an PSII-Membranen aus Spinat deuten auf eine heterogene LHCII-Bindung an PSII-Komplexen. Drei Zustandsformen gebundener LHCII-Trimere an sogenannten Superkomplexen (PSII-Dimere mit LHCII) und zwei unterschiedliche Megakomplexe (zwei miteinander assoziierte Superkomplexe) wurden gefunden. (Boekema *et al.*, 1999). PSI dagegen wurde bisher als monomerer Komplex charakterisiert, an dem vier LHCI-Dimere assoziiert sind (Boekema *et al.*, 1994; Jansson *et al.*, 1996). Einige Daten sprechen jedoch dafür, daß auch PSI höhermolekulare Komplexe bildet (Schmid, 1999, persönliche Mitteilung).

Alle zehn Antennen-Untereinheiten (Lhca1-4, Lhcb 1-6) sind kerncodiert. In höheren Pflanzen ist die LHC-Transkription Licht- und von dem Entwicklungszustand der Plastiden abhängig (Grossman *et al.*, 1995; Reinbothe und Reinbothe, 1996). Die Licht-Regulation der Genexpression verläuft über Phytochrom und UV/Blaulicht-Rezeptoren (Thompson und White, 1991; Marrs und Kaufmann, 1989). Die ebenfalls Licht-abhängige Chlorophyll-Biosynthese ist nicht nur für die Stabilisierung von LHCII essentiell, sondern über einen bisher unbekannten Mechanismus auch mit der Transkription der Lhcb-Gene gekoppelt (Meehan *et al.*, 1996).

Einige Daten sprechen dafür, daß Chlorophyll-Vorstufen ein Signal für die Lhcb-Transkription darstellen (Taylor, 1989; Kropat *et al.*, 1997).

Der Transport der posttranslational in den Chloroplasten transportierten Lichtsammelproteine über den allgemeinen Import-Weg und den SRP-abhängigen Transit im Stroma wird in Kapitel 1.2 ausführlich beschrieben.

1.2 Die Zielsteuerung kerncodierter Chloroplasten-Proteine

In Chloroplasten finden wichtige Biosynthese-Prozesse, wie Lipid- und Aminosäuresynthese und die mit der Photosynthese gekoppelte Bildung von Kohlenhydraten statt. Physiologisch betrachtet handelt es sich daher um hochkomplexe Organellen. Aber auch architektonisch gesehen sind die Chloroplasten sehr komplex strukturiert. Sie können bei höheren Pflanzen in sechs Kompartimente untergliedert werden (Abbildung 1.1.2-2).

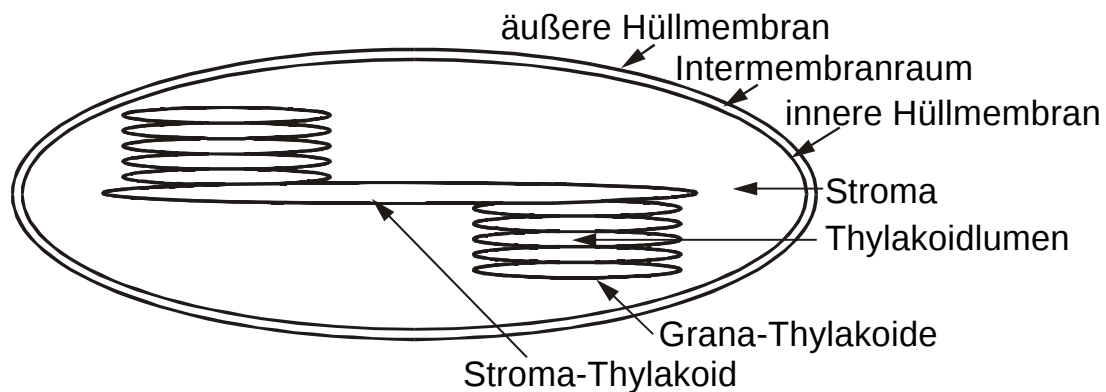


Abbildung 1.1.2-1 Schematische Darstellung der Chloroplasten-Kompartimente

Die wäßrige Matrix, auch als Chloroplastenstroma bezeichnet, wird zum Cytoplasma hin von einer doppelten Hüllmembran abgetrennt. Zwischen diesen Membranen liegt der wäßrige Intermembranraum. Das Stroma birgt ein inneres Membransystem, die sogenannten Thylakoide, die selbst wieder eine wäßrige Matrix, das Thylakoidlumen, umschließen. Die meisten Proteine der photosynthetischen Lichtreaktion sind in bzw. an der Thylakoidmembran lokalisiert. Die beteiligten Polypeptide liegen größtenteils mit Cofaktoren (Redoxfaktoren oder Chromophore) assoziiert vor. Die verschiedenen Proteine sind wiederum zu sogenannten supramolekularen Komplexen organisiert (PSI, PSII, Cytb₆/*f*-Komplex, CF₀/CF₁-ATPase).

Der Ursprung von Organellen geht auf endosymbiotische Prozesse zurück. Während der Co-Evolution von Plastiden und Wirt haben die Plastiden allmählich ihre Autonomie verloren. Viele Gene, die für plastidäre Proteine codieren, wurden in das Kern-Genom des Wirts transferiert. Beide Organellen (Kern, Plastide) codieren für miteinander in Wechselwirkung stehende Proteine. Daher sind eine strikte Regulation der Protein-Biosynthese und die richtige Zielsteuerung der Proteine von fundamentaler Bedeutung für die Funktion der Plastiden. Die Voraussetzungen für den Transport der Proteine sind, daß sie in Translokations-kompetenter Form vorliegen und von spezifischen Translokationssystemen erkannt werden. Nur so kann ein topologisch korrekter Transfer membranständiger Protein-Abschnitte in Ziel-Membranen und die effiziente Translokation löslicher Proteine oder Protein-Domänen auf die *trans*-Seite von Membranen gewährleistet werden. Bis auf die Ausnahme einiger weniger spontan inserierender Proteine werden alle kerncodierten Chloroplasten-Proteine über einen allgemeinen Importkomplex in die Plastiden importiert (Kapitel 1.2.1). Für die weitere Zielsteuerung durch/in die Thylakoidmembran sind vier unterschiedliche Mechanismen bekannt. Diese sind bis auf die Ausnahme spontan inserierender Proteine mit Transport-assistierenden Protein-Komponenten gekoppelt. Dazu zählen der Sec-abhängige Transport, der ΔpH-Weg sowie der cpSRP-Weg. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Lichtsammelproteine Lhcb1 und Lhca1 werden via cpSRP-Weg durch das Stroma transportiert. Um einen Einblick in die Transportsysteme der Chloroplasten zu liefern, werden jedoch alle Transportprozesse in den folgenden Kapiteln vorgestellt (Kapitel 1.2.1 und 1.2.2).

1.2.1 Der Import kerncodierter Proteine über den allgemeinen Translokationskomplex

Das Importsystem kerncodierter Proteine, das den Transport von Proteine über die Hüllmembranen bewerkstelligt, muß zunächst erkennen können, daß das entsprechende Protein für die Plastide bestimmt ist. Diese Voraussetzung wird durch das Zusammenwirken zweier Translokationssysteme erfüllt, die in der äußeren Hüllmembran (Toc-Komplex; Translocon at the outer chloroplast envelope) und der inneren Hüllmembran (Tic-complex, Translocon at the inner chloroplast envelope) lokalisiert sind. Weitere Proteine des Cytosols, des Intermembranraums und des Stromas sind an der Translokation beteiligt. Am Import von Proteinen in die Plastide sind verschiedene Chaperone (HSP 70, HSP 100 und GroEL/GroES) beteiligt (Cline und Henry, 1997; Heins und Soll, 1998; Soll, 1998). Die kerncodierten Chloroplasten-Proteine werden im Cytosol als "Vorläufer"-Proteine mit einem spaltbaren Erkennungssignal synthetisiert. Es handelt sich dabei um N-terminale Signalpeptide (STD, Stromal Targeting Domain), die notwendig und ausreichend sind, um das Protein vom Cytosol

in das Chloroplastenstroma zu importieren. Im allgemeinen ist die Signalsequenz hydrophil, reich an hydroxylierten Aminosäuren und trägt aufgrund des Fehlens saurer Aminosäuren eine positive Nettoladung. Der äußere N-Terminus ist ungeladen und enthält keine Glyzin- oder Prolin-Reste (Cline und Henry, 1997; Heins und Soll, 1998). Eine konservierte Sekundärstruktur, wie sie z.B. für den Import mitochondrialer Proteine gefunden wurde (Übersichtsartikel siehe Neupert, 1997), konnte nicht nachgewiesen werden. Das Signalpeptid scheint eine zufällige Struktur einzunehmen (Von Heijne und Nishikawa, 1991). Der Translokationsschritt selbst ist ATP- und GTP-abhängig, wobei ATP sehr wahrscheinlich für die Aktivität der Hitzeschockproteine benötigt wird, während GTP-bindende Domänen an den Toc-Proteinen Toc34 und Toc160 lokalisiert sind (Kessler *et al.*, 1994). Das Protein wird mit dem N-Terminus voran zunächst sehr tief und irreversibel in den Translokations-Kanal des Toc-Komplexes inseriert (Theg und Scott, 1993). Die weitere Translokation ist von stromalem ATP abhängig und mit einer Interaktion zwischen Toc und Tic gekoppelt, bei der die beiden Membranen in engem Kontakt miteinander zu stehen scheinen. (Schnell und Blobel, 1993). Schließlich wird das Protein in das Stroma entlassen und von der Stroma-Peptidase (SPP) prozessiert.

Überraschenderweise weisen die Toc- und Tic-Proteine im Gegensatz zu den intraplastidären Transportmechanismen, keine strukturelle Homologie zu bakteriellen Exportsystemen auf (SRP-, Sec oder Δ pH-Weg; siehe Kapitel 1.2.2). Nur für einige Proteine (Toc75, Tic20 und Tic 22) wurden Homologe in *Synechocystis sp.* PP6803 gefunden. Der Importapparat scheint sich während der Evolution von Chloroplasten aus sowohl cynaobakteriellen, als auch eukaryotischen Vorläufern entwickelt zu haben, und somit dualen Ursprungs zu sein (Reumann und Keegstra, 1999, Reumann *et al.*, 1999).

1.2.2 Zielsteuerung von Proteinen innerhalb des Chloroplasten

Ein Teil der in das Chloroplastenstroma importierten Proteine wird weiter in die Thylakoide oder das Thylakoidlumen transportiert. Die Beobachtung, daß der Transport verschiedener Proteine zum Teil von unterschiedlichen Energiequellen und Protein-Komponenten abhängig ist, führte zur Aufdeckung vier verschiedener Translokations-Mechanismen über die Thylakoidmembran (Kapitel 1.2.2.1-1.2.2.3, Abbildung 1.2.2-1).

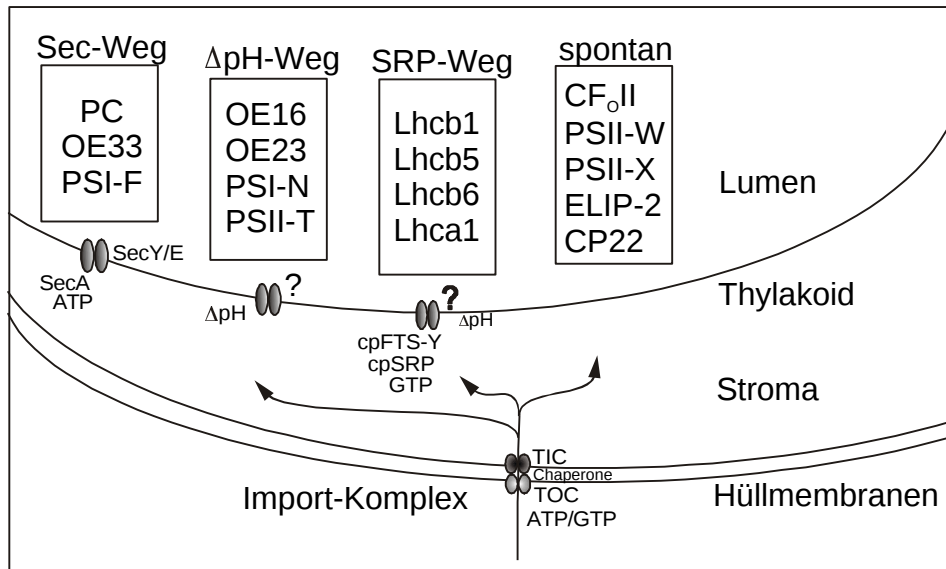


Abbildung 1.2.2-1 Protein-Zielsteuerung über die Thylakoidmembran

1.2.2.1 Sec- und DpH abhängige Protein-Translokation

Kerncodierte Proteine, die in das Thylakoidlumen transportiert werden haben innerhalb des Chloroplasten den weitesten Weg vor sich, denn um zu ihrem Zielort zu gelangen, müssen sie fünf Kompartimente passieren. Während fast alle stromalen und thylakoidalen Proteine nach dem Import durch die Stroma-Peptidase (SPP) maturiert werden (Richter und Lamppa, 1998), führt die Prozessierung durch die SPP bei lumenalen Proteinen zur Bildung stromaler Intermediate. Erst durch die Thylakoid prozessierende Protease (TPP), die membranständig im Lumen der Thylakoide lokalisiert ist, werden die Transport-Intermediate in die mature Form überführt (James *et al.*, 1989; Chaal *et al.*, 1998). Lumenale Proteine werden demnach mit einem Zwei-Schritt-Mechanismus zielgesteuert. Die Signalsequenz dieser Proteine wird entsprechend als Bipartite-Sequenz bezeichnet. Der N-terminale Bereich dieser Sequenz korrespondiert dabei mit der Signalsequenz stromaler Proteine (STD, siehe 1.2.1 oben). Auf die STD folgt das zweite transiente Signal, das der Zielsteuerung in, bzw. durch die Thylakoidmembran dient. Dieses Signal, auch als LTD, Lumenal-Targentig-Domain bezeichnet, weist in der Regel drei charakteristische Domänen auf: Die N-Domäne umfaßt einen positiv geladenen N-terminalen Bereich; die H-Domäne besteht aus einem hydrophoben Kernbereich; die C-Domäne im C-terminalen Abschnitt des Signalpeptids ist polar und trägt kurze Seitenketten (meist Ala) in der -3 und -1 Position der Schnittstelle. Die gleichen Charakteristiken weisen bakterielle Export-Signalpeptide auf (Settles und Martienssen, 1998; Dalbey und Robinson,

1999). Tatsächlich wurden in Bakterien überexprimierte lumenale Proteine (PC und OE33) effizient exportiert (Henry *et al.*, 1997; Haehnel *et al.*, 1994; Seidler, 1990). Auch die Reaktions-Spezifität der TPP ist den bakteriellen Signalpeptidasen sehr ähnlich (Chaal *et al.*, 1998; Halpin *et al.*, 1989). Die Ähnlichkeit zum bakteriellen Sekretionssystem (Sec) führte zur erfolgreichen Suche nach homologen Proteinen in Plastiden. SecA liefert die Energie, die für die Translokation notwendig ist. Das Protein ist eine stromale ATPase (Berghofer *et al.*, 1995; Hulford *et al.*, 1994; Karnauchov *et al.*, 1994; Mant *et al.*, 1994; Nakai *et al.*, 1994; Yuan *et al.*, 1994). Auch ein SecY-Homologes, das in *E.coli* Teil des SecYEG-Kanals ist, wurde aus Pflanzen kloniert, und erfolgreich in Thylakoide inseriert (Laidler *et al.*, 1995). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, daß Antikörper, die gegen cpSecY gerichtet sind, den Sec-abhängigen Proteintransport hemmten, nicht aber den Transport Δ pH- oder SRP-abhängiger Substrate (Mori *et al.*, 1999) (siehe folgenden Abschnitt und Kapitel 1.2.2.3).

Nicht alle lumenalen Proteine werden über den Sec-Weg transportiert. Der Transport der Proteine OE23, OE16, PSI-N und PSII-T ist weder von stromalen Faktoren noch von ATP abhängig, sondern nur vom thylakoidalen Protonengradienten (Δ pH) (Cline *et al.*, 1992; Henry *et al.*, 1994; Klösgen *et al.*, 1992; Mould und Robinson, 1991; Nielsen *et al.*, 1994). Dabei weisen jedoch auch diese Proteine die typische Bipartite-Signalsequenz auf. Es stellte sich die Frage, inwiefern sich die Signale dieser unterschiedlich transportierten Proteine unterscheiden. Der Vergleich der Zielsteuerungssignale zeigte, daß Sequenzen des Δ pH-Wegs ein Zwillings-Arginin N-terminal der hydrophoben Region aufweisen (Chaddock *et al.*, 1995). Dieses Aminosäure-Paar scheint jedoch nicht der einzige Faktor für die Zielsteuerung über den Δ pH-Weg zu sein. Ein "Sec-Vermeidungs-Motiv" wurde bei OE23 gefunden, das neben dem Zwillings-Arginin ein Lysin C-terminal der H-Domäne aufweist, welches notwendig und ausreichend ist, um das Protein nicht über den Sec-Weg zu transportieren (Bogsch *et al.*, 1997).

Während die charakterisierten Proteine des thylakoidalen Sec-Wegs starke Homologien zum bakteriellen Sec-Transportsystem aufweisen, wurde zunächst in Bakterien keine Komponente des Δ pH-Translokationsapparates gefunden. Auch Proteine, deren Transport von einem Protonengradienten abhängig ist, konnten in Bakterien nicht gefunden werden. Daher wurde zunächst vermutet, daß es sich beim Δ pH-Weg um einen neuen, Plastiden-spezifischen Weg handelt. Dann wurden Mais-Mutanten isoliert, die einen Defekt in der Thylakoid-Protein-Translokation aufwiesen (Voelker und Barkan, 1995). Die Mutanten akkumulierten Proteine im Stroma, deren Transport entweder Sec- oder Δ pH-abhängig war. Die Mutante *tha1* wurde als *secA*-Mutante charakterisiert (Voelker *et al.*, 1997). Eine zweite Mutante *hcf1* dagegen akkumulierte Proteinintermediate typischer Δ pH-Substrate im Stroma (iOE23 und iOE16). Außerdem kann der *in-vitro* Transport dieser Δ pH-abhängigen Proteine bei Wildtyp-Chloroplasten mit *hcf1*-Antikörpern gehemmt werden (Mori *et al.*, 1999). Durch die Klonierung des Gens (Settles *et al.*, 1997), das für ein Transmembran-spannendes Protein mit stromaler globulärer Domäne codiert, wurden schließlich auch Bakterien-Homologe gefunden. Die Analyse von *E.coli* Transport-Mutanten, die in der Fähigkeit eingeschränkt waren

bakterielle Proteine mit einem typischen ΔpH Zwillings-Arginin-Motiv zu transportieren (Santini *et al.*, 1998; Weiner *et al.*, 1998), führte zur Aufdeckung eines Operons (*MttABC*), das aller Wahrscheinlichkeit nach für einen Translokationskomplex codiert. *MttA1* und *MttA2* (*tatA* und *tatB*) weisen dabei Homologien zu *Mais-Hcf106* auf (Weiner *et al.*, 1998; Settles und Martienssen, 1998). Als Substrate dieses Transportweges in Bakterien werden periplasmatische Proteine diskutiert, die Redox-Faktoren enthalten. Solche Proteine enthalten zum einen ein Zwillings-Arginin im Signalpeptid. Zum andern erfolgt der Einbau der Cofaktoren und die damit verbundene Faltung dieser Proteine sehr wahrscheinlich im Cytosol. Mit Ausnahme von peroxysomalen Proteinen galt bisher als Charakteristikum des posttranslationalen Transports über biologische Membranen, daß die zu transportierenden Proteine entfaltet vorliegen müssen (Endo *et al.*, 1994). Dies wurde doch in den letzten Jahren widerlegt, als man zeigen konnte, daß rekombinante Proteine, die mit dem thylakoidalen ΔpH -Weg in das Lumen transportiert werden, gefaltet vorliegen können (Clark und Theg, 1997; Hynds und Robinson, 1998; siehe auch Kapitel 4.3 der Diskussion). Ein entsprechendes ΔpH -Translocon, das gefaltete Proteine transportiert, die ein Zwillings-Arginin-Motiv aufweisen, scheint damit auch in Bakterien zu existieren.

1.2.2.2 Spontane Insertion in Thylakoide

Die spontane Integration von Proteinen in die Thylakoidmembran wurde zuerst bei einer Unter-einheit der ATP-Synthase (CF_0II) aufgedeckt. Das Protein besitzt eine Membran-spannende und eine stromale Domäne. Nur ein kleiner N-terminaler Abschnitt wird ganz über die Thylakoidmembran translociert. Das Protein wird mit einer von SPP und TPP spaltbaren Bipartite-Sequenz synthetisiert. Da für die Integration dieses Proteins keine stromalen oder thylakoidalen Faktoren, ATP oder ein Protonengradient notwendig sind, scheint das Protein tatsächlich die Kompetenz für eine spontane Membraninsertion zu besitzen (Michl *et al.*, 1994). Weitere, spontan inserierende Proteine sind PSII-W, PSII-X, sowie PsbY (Kim *et al.*, 1998; Mant und Robinson, 1998, Thompson *et al.*, 1999). PsbY weist eine weitere Besonderheit auf: Von ursprünglich vier Membran-spannenden Domänen des Loop-Intermediats, bilden schließlich nur zwei Domänen zwei voneinander unabhängige mature Proteine. D.h. hier hat nicht nur das Signalpeptid, sondern eine zusätzliche hydrophobe Domäne Translokations-assistierende, Signalpeptid-ähnliche Eigenschaften (Thompson *et al.*, 1998). Da die Integration der Proteine spontan erfolgt, stellen hydrophobe Interaktionen zwischen den Signalsequenzen und den Transmembran-Domänen in diesem Fall die einzige treibende Kraft der Membraninsertion dar. Interagierende hydrophobe Domänen können während der Translokation hydrophile sowie hydrophobe Bereiche in optimaler Weise maskieren bzw. exponieren. Im Allgemeinen ist die Wechselwirkung zwischen zwei Helices stärker, als die Wechselwirkung einer Helix mit Lipiden. Dies liegt zum einen an der Maximierung des Van-der-Waals-Kontakts durch das dichte "Packen" der Helices (Helix/Helix und Lipid/Lipid). Zum anderen weisen freie Lipide in einer Lipid-Umgebung außerdem einen höheren Freiheitsgrad auf, als Helix umgebende Lipide (Beitrag zu ΔG_{net}) (Lemmon *et al.*, 1997, ed. von Heijne, 1997).

In der Literatur wird diskutiert, daß die Interaktionen wahrscheinlich auch den Transport hydrophiler, meist negativ geladener Abschnitte, zwischen den hydrophoben Domänen erleichtern (Thompson *et al.*, 1998).

1.2.2.3 Der SRP-abhängige Transport von Lhcb1 und anderen integralen Membran-Proteinen

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Lichtsammelproteine werden SRP-abhängig (Signal Recognition Particle) über die Thylakoidmembran transportiert. Dieser Proteintransport, wurde zuerst bei sekretorischen Proteinen entdeckt, die cotranslational über das eukaryotische endoplasmatische Retikulum (eR) transportiert werden (siehe Übersichtsartikel High, 1995). SRP wurde als Ribonukleoprotein identifiziert, das bei Säugern aus sechs Polypeptiden und einer 7S RNA besteht (Rapoport *et al.*, 1996). Nur eine der Protein-Untereinheiten, SRP54, bindet an die hydrophobe Signalsequenz des naszierenden Polypeptids (Walter und Johnson, 1994). Zur korrekten Zielsteuerung des Proteins an den Translokations-Kanal muß der eukaryotische SRP wiederum einem weiteren cytosolischen Komplex (NAC) sowie mit dem SRP-Rezeptor, SR α , interagieren. Sowohl SRP54 als auch SR α haben GTP-bindende und hydrolysierende Eigenschaften. Die GTP-Hydrolyse scheint für die Ablösung der interagierenden Proteine eine Rolle zu spielen, was in der Rezyklisierung von SRP und SR α resultiert. SR β , ist der membranständige Rezeptor für SR α . Als integrale Membran-Komponenten des Translokationsapparates wurden der aus 3 Untereinheiten bestehende Sec61-Komplex, sowie das in TRAM-Protein (bei Säugern) identifiziert. Im Lumen des eR scheinen Chaperone der Hsp70-Familie an der weiteren Translokation beteiligt zu sein (BiP; heavy chain binding protein). SRP Homologe wurden auch in Bakterien gefunden. Über diesen Weg werden hauptsächlich Proteine der Cytoplasma-Membran translociert. Hier besteht SRP aus der Protein-Untereinheit Ffh und einer 4,5 S RNA. Dem SRP α homolog ist FtsY. In Chloroplasten setzt sich der SRP aus cpSRP54 und cpSRP43 zusammen. Während cpSRP54 das plastidäre Gegenstück zu SRP54 ist, gibt es keine Hinweise auf die Bindung von RNA im Komplex. Wahrscheinlich ersetzt cpSRP43 die RNA (Schuenemann *et al.*, 1998; Schuenemann *et al.*, 1999; Franklin und Hoffman, 1993; Klimyuk *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1995).

Das am besten untersuchte Substrat des plastidären SRP-Wegs ist Lhcb1. Importiertes Lhcb1 passiert das Stroma in löslicher Form (Cline *et al.*, 1989; Reed *et al.*, 1990). Erste Experimente mit rekombinantem Lhcb1 zeigten, daß das Protein in Gegenwart von GTP und Stroma in Thylakoide inseriert werden kann (Cline, 1986; Chitnis *et al.*, 1987; Hoffman und Franklin, 1994). *In vitro* bildet Lhcb1 zusammen mit cpSRP einen löslichen Transitkomplex (Payan und Cline 1991; Franklin und Hoffman, 1993; Li *et al.*, 1995; Klimyuk *et al.*, 1999; Schuenemann *et al.*, 1998). Die Stöchiometrie der Untereinheiten beträgt dabei zwei cpSRP43 pro pSRP54 und Lhcb1 (Tu *et al.*, 1999). Die Bildung dieses Komplexes reicht jedoch nicht aus, um Lhcb1 *in vitro* in isolierte Thylakoide zu inserieren. Ein weiterer Faktor, cpFtsY, der für die Zielsteuerung von Lhcb1 essentiell zu sein scheint, wurde kürzlich aus *Arabidopsis* isoliert.

Dieses Protein weist starke Homologien zur Säugetier SRP α -Untereinheit, bzw. dem bakteriellen FtsY-Protein auf und bindet ebenfalls GTP (Kogata *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, daß die *in vitro*-Insertion von Lhcb1 in Anti-FtsY behandelten Thylakoiden stark gehemmt wird (Kogata *et al.*, 1999). Tu *et al.*, 1999 konnten zeigen daß *in vitro* synthetisierte Komponenten von cpSRP zusammen mit cpFtsY ausreichend sind, um rekombinantes Lhcb1 in isolierte Thylakoide zu inserieren. Stromaler Extrakt mußte bei der Insertionsreaktion nicht mehr supplementiert werden. Demnach sind alle stromalen Faktoren, die zur Integration von Lhcb1 in Thylakoide notwendig sind, identifiziert.

Weitere Proteine, die zur korrekten Zielsteuerung von cpSRP abhängig sind, sind die Antennenproteine Lhca1, Lhcb5 (CP26) (Kim *et al.*, 1999) sowie Lhcb6 (CP24) (Cai *et al.*, 1993; Klösgen, 1997). Dagegen scheint die Membraninsertion zweier eng mit den Antennenproteinen verwandter Proteine (PsbS, Elip2) spontan stattfinden zu können, denn Sec-, Δ pH- oder SRP-Komponenten waren für die stabile Integration der Proteine in die Membran nicht notwendig. Durch eine Zugabe stromalen Extrakts zur Integrations-Reaktion wurde die Einbaueffizienz erhöht, so daß vermutet wurde, daß diese Proteine sowohl spontan, als auch cpSRP-assistiert inserieren (Kim *et al.*, 1999).

Die spezifischen Funktionen der einzelnen Untereinheiten, bei der Lhcb1 Zielsteuerung sind noch nicht vollständig geklärt. Erste Hinweise dafür, daß cpSRP54 auch eine Rolle bei der Translokation Plastiden-codierter Proteine zukommen könnte, erhielt man bei der Reinigung des Proteins, das etwa zur Hälfte mit 70S-Ribosomen der Plastiden cofraktionierte (Franklin und Hoffman, 1993; Schuenemann *et al.*, 1998). Mittels "Crosslinkexperimenten" konnte gezeigt werden, daß isolierte Komplexe naszierender, Ribosomen-gebundener D1-Polypeptide im homologen Chloroplasten Translationssystem mit cpSRP54 interagieren. Mit SecA oder cpSRP43 wurden dagegen keine "Crosslink"-Produkte gefunden (Nilsson *et al.*, 1999). Auch Mutanten-Analysen ergaben, daß cpSRP54 wahrscheinlich mehr Funktionen in der Plastide erfüllt, als die Translokation kerncodierter Antennenproteine. Die Untersuchungen ergaben folgendes Bild: *Arabidopsis*-Mutanten mit einer dominant negativen Mutation in cpSRP54 entwickelten anfangs Blätter mit gelbem Phänotyp. Während der Chlorophyll-Gehalt gegenüber den Wildtyp-Pflanzen um 75% reduziert war, war das Chl *a/b*-Verhältnis vergleichbar geblieben. Die Mutation zeigte weiterreichende Effekte auf die Chloroplasten-Biogenese, denn verschiedene auch nicht pigmentierte Proteine lagen gegenüber Wildtyp-Pflanzen reduziert vor. Obwohl der Gehalt an cpSRP54 reduziert blieb, ergrünten die Pflanzen später, was darauf hindeutet, daß eine Reduktion von cpSRP54 durchaus kompensiert werden kann. (Pilgrim *et al.*, 1998).

In *Arabidopsis chaos*-Mutanten dagegen lagen in Thylakoiden ausschließlich Antennenproteine reduziert vor, was sich auch auf das Chl *a/b*-Verhältnis auswirkte. Dieses lag signifikant höher als bei Wildtyp-Pflanzen (*chaos* Chl *a/b* 3,2; wt Chl *a/b* 2,6) (Klimyuk *et al.*, 1999). Die Schlußfolgerung aus der Mutanten-Analyse ist, daß cpSRP43 primär an der Biogenese der Antennenproteine beteiligt zu sein scheint, während cpSRP54 wahrscheinlich zusätzlich an der Biogenese cotranslational synthetisierter Proteine beteiligt ist.

Es ist nicht bekannt wie sich der vermutete Translokationskomplex der SRP-assistierten Lhcb1-Zielsteuerung zusammensetzt. In *E.coli* konnte über Crosslinkingexperimente eine Beteiligung von Sec-Proteinen am Transport SRP-abhängiger Proteine gezeigt werden (De Gier *et al.*, 1998). Der Sec-Translokationskomplex hat zwar Homologien zum eukaryotischen Sec61p-Komplex, dem Translocon des endoplasmatischen Retikulums (Hartmann *et al.*, 1994), die Beteiligung des Sec-Translocons in Thylakoiden erscheint jedoch sehr unwahrscheinlich. Dies geht aus mehreren Untersuchungen hervor: Konkurrenzexperimente mit dem via Sec-Weg transportierten Protein pOE33 und Lhcb1 zeigten keine signifikante Hemmung der Integration von Lhcb1 (Cline *et al.*, 1993). Weiterhin ist die Lhcb1 Translokation, im Gegensatz zur OE33-Translokation, nicht mit Azid, einem Sec-A-Inhibitor, hemmbar (Yuan *et al.*, 1994), was zumindest die Beteiligung der löslichen Komponente (SecA) ausschließt. Dies ist konsistent mit der Beobachtung, daß die Thylakoid-Integration von Lhcb1 ohne stromale Komponenten, nur mit der Supplementation von SRP und cpFtsY möglich ist (Tu *et al.*, 1999). Auch die Beobachtung, daß Antikörper gegen cpSecY den Sec-abhängigen Proteintransport hemmten, nicht aber den Transport Δ pH- oder SRP-abhängiger Substrate, spricht gegen die Beteiligung des Sec-Translocons an der SRP-Zielsteuerung (Mori *et al.*, 1999). Damit steht die Identifikation des Translokations-Mechanismus für den SRP-abhängigen Transport immer noch aus. Bisher wurde außerdem nicht geklärt, in welcher Orientierung Lhcb1 die Membran passiert. Die EM-Daten zeigen nur die endgültige Orientierung von LHCII in der Membran, nicht aber welche Topographie das Protein mit seinen vier α -helikalen Abschnitten während des Translokations-Prozesses einnimmt.

An dieser Stelle soll noch auf interessante Besonderheiten der Lhcb-Zielsteuerung in anderen Organismen hingewiesen werden: Eine völlig andere Variante des Transports von Lichtsammelproteinen schlagen Hooper und Kollegen aufgrund von Untersuchungen an Grünalgen vor (Hooper *et al.*, 1994; White *et al.*, 1996, Park und Hooper, 1997, Wolfe *et al.*, 1997). EM Studien an verschiedenen *Chlamydomonas*-Stämmen gaben bei diesem einzelligen Organismus Hinweise auf eine Pigment-abhängige Assemblierung von LHCII in der inneren Chloroplasten Hüllmembran und einen mit der Einschnürung der inneren Hüllmembran gekoppelten Vesikel-Transport innerhalb dieser Alge. Bei dem Protisten *Euglena* weicht der Import von Lhcb insofern vom allgemeinen Import-Mechanismus höherer Pflanzen und Grünalgen ab, daß das Protein mit einer weiteren Signalsequenz zunächst cotranslational zum endoplasmatischen Retikulum gesteuert wird (Sulli *et al.*, 1999). Der Weg läßt sich weiter zum Golgi-Apparat und dann zum Chloroplasten verfolgen. Zwischen den drei Organellen erfolgt der Transport über Vesikel (Sulli und Schwartzbach, 1995). Dieser an Vesikel gekoppelte Weg scheint hier eine evolutionäre Konsequenz aus der Bildung einer dritten

Chloroplasten-Hüllmembran bei *Euglena* zu sein, welche wahrscheinlich aus einer sekundären Endosymbiose eines phagotrophen Trypanosomen-ähnlichen Organismus stammt. Die Membran scheint dabei aus der Vakuole des Wirts abzustammen. Um das Protein des in den Kern verlagerten Lhcb-Gens weiterhin in die Chloroplasten zu dirigieren, war ein weiteres Signalpeptid essentiell. Nur so wurde sichergestellt, daß die zusätzlich erlangte, von Vakuolen abstammende *Euglena*-Hüllmembran passierbar bleibt. Weitere Beispiele für den evolutionären Ursprung von Zielsteuerungs-Mechanismen bei Algen mit mehr als zwei Hüllmembranen sind aus Sulli *et al.*, 1999 zu entnehmen.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Biogenese der Lichtsammelproteine ist in vielen Punkten noch nicht aufgeklärt. Während die Faktoren des posttranslationalen Transports von Lhcb1 durch das wäßrige Chloroplastenstroma, innerhalb der letzten Jahre charakterisiert werden konnten (Payan und Cline *et al.*, 1991; Franklin und Hoffman, 1993; Li *et al.*, 1995; Schuenemann *et al.*, 1998; Kogata *et al.*, 1999, Tu *et al.*, 1999), ist über den Mechanismus des Membran-einbaus nur wenig bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es diesen Mechanismus in Hinblick auf die Topographie von Lhcb1 während des Einbaus in die Thylakoidmembran genauer zu untersuchen. Der Einbau von Lhcb1 scheint ein sehr schneller Prozeß zu sein, denn Einbau-Intermediate konnten bisher nicht gefunden werden. Um dennoch Hinweise auf die Orientierung einzelner Proteindomänen während dieses Prozesses zu erhalten, sollte rekombinantes Lhcb1 mit Hilfe molekularbiologischer Methoden in einzelnen Domänen verändert und *in-vitro* in isolierte Thylakoidmembranen eingebaut werden. Die Veränderung in der Proteindomäne sollte so konzipiert werden, daß sich die Fähigkeit des Proteins zur Faltung und Pigmentbindung nicht verändern würde, während dagegen die Membran-Überquerung unter bestimmten Bedingungen spezifisch hemmbar sein sollte.

Es wurde bereits gezeigt, daß eine Einführung von sechs aufeinanderfolgenden Histidin-Resten ("His-Tag") in Proteine deren Struktur nicht signifikant verändert hat (Rothen *et al.*, 1996; Yoshihisa und Ito, 1996). Auf der anderen Seite konnten "His-Tags", die sehr stabile Metall-Komplexe bilden, dazu benutzt werden, den Transport dieser Proteine über biologische Membranen zu hemmen. Aus diesem Grund schien ein "His-Tag" die geeignete Markierung zur Untersuchung topographischer Restriktionen während des Lhcb1-Membraneinbaus zu sein. Zunächst sollten "His-Tags" an verschiedenen Positionen von Lhcb1, bzw. pLhcb1 eingeführt werden. Dazu standen Expressions-Vektoren mit den codierenden DNA-Sequenzen zur Verfügung (Dilly-Hartwig *et al.*, 1998; Paulsen *et al.*, 1990). Mit Hilfe von Klonierungstechniken sollten diese an folgenden Positionen mit einem "His-Tag"-Oligonukleotid ligiert werden: C-terminal von Lhcb1 und pLhcb1, in der stromalen Schleifendomäne zwischen Helix A und C, sowie im N-proximalen Bereich von Helix B. Ein am N-Terminus markierter Klon (44C.3) stand bereits zur Verfügung.

Anschließend sollten die Lhcb1-Derivate in *E.coli* überexprimiert und auf ihre Fähigkeit getestet werden, sich wie das Wildtyp-Protein in *in-vitro*-Faltungsexperimenten (Paulsen *et al.*, 1990; Paulsen *et al.*, 1993) spontan zu Pigment-Protein Komplexen zu falten. Damit sollte ausgeschlossen werden, daß ein "His-Tag" die Faltungs-Kompetenz des Proteins verändern würde. In diesem Falle wäre auch eine Faltung zu LHCII in Thylakoidmembranen nicht zu erwarten gewesen. Schließlich sollten die Proteine darauf hin untersucht werden ob sie mit einem bereits in der Arbeitsgruppe etablierten nach Yuan *et al.*, 1993 modifizierten Insertionssystem (Kuttkat *et al.*, 1995), stabil in isolierte Thylakoide eingebaut werden können. Durch die Komplexierung der "His-Tags" mit Metallionen, sollte der Membran-Einbau Derivate spezifisch gehemmt werden. Eine Hemmung des Einbaus wurde nur bei solchen Derivaten vermutet, die den "His-Tag" in einer Domäne tragen, welche die Membran während

der Translokation in jedem Fall passieren muß. Dagegen sollten "His-Tags" in Domänen, die nicht über die Membran transportiert werden, nicht in ihrer Einbaufähigkeit gehemmt werden.

An der Insertion der Lichtsammelproteine ist möglicherweise ein Translokationskomplex beteiligt. Zur Untersuchung dieser Frage wäre es wünschenswert Membran-assoziiertes Lhcb1 als Zwischenprodukt zu isolieren. Ein "His-Tag" könnte sich dabei als eine Art "Anker" nützlich zeigen. Ein weiterer Punkt in der Arbeit bestand daher darin, zu untersuchen wie gut sich ein "His-Tag" als Affinitäts-Markierung im Hinblick auf eine Insertionsreaktion eignen würde. Die Affinität von Metallionen für aufeinanderfolgende Histidin-Reste ist bereits beschrieben (Porath und Ohlin, 1993; Hochuli *et al.*, 1987). Hier sollte noch abgeklärt werden, wie stark und wie spezifisch die Bindung der "His-Tag"-Derivate an immobilisierte Metallionen ist, wenn diese Derivate stark verdünnt in einem hoch konzentrierten Proteingemisch (Stromaextrakt/Thylakoide) vorliegen. Dazu sollte gleichzeitig ein besonderer, Metallionen-Träger, getestet werden. Es handelte sich hierbei um paramagnetische Partikel, die gegenüber einer Säule den Vorteil haben, daß Lösungen sehr schnell abgenommen werden können, wenn die Partikel mit Hilfe eines Magneten an die Wand des Reaktionsgefäßes gebracht werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es die Biogenese von Lhca1, einem Antennenproteins von PSI, zu untersuchen. Hier stand die Frage im Vordergrund, ob auch Lhca1 in isolierte Thylakoide inseriert und anschließend als stabil inseriertes, Protease-resistentes Insertions-Produkt nachgewiesen werden kann. Da das Gen im Lhca1-Überexpressionsvektor ursprünglich aus Tomate stammt, sollte die Insertion zunächst mit dem etablierten Erbsensystem (Stromaextrakt/Thylakoide) getestet, und dann auf ein für Lhca1 homologes System ausgeweitet werden. In der Literatur ist beschrieben, daß Lhca1 *in vivo* und *in vitro* zusammen mit Lhca4 Heterodimere bildet. Weiterhin sind unter den in der Arbeitsgruppe verwendeten elektrophoretischen Trennbedingungen PSI-Komplexe im Gegensatz zu PSII-Komplexen sehr stabil. Daraus ergab sich die Frage, ob die Insertion von Lhca1 alleine ausreichen würde, um nach einer Insertionsreaktion Dimere oder gar an PSI assemblierte Proteine nachweisen zu können.

Schließlich sollten im Zuge dieser Doktorarbeit Insertionsexperimente mit Lhcb1-Derivaten durchgeführt werden, bei denen Aminosäuren, die als Chlorophyll-Liganden charakterisiert sind durch andere, nicht bindende Aminosäuren ersetzt wurden. Die Experimente sollten Daten, die in der Arbeitsgruppe aus *in-vitro* Faltungen gewonnen wurden erhärten und vervollständigen (Yang *et al.*, 1999). Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Untersuchung der Trimerisierungs-Kompetenz dieser Mutanten.

2 Material und Methoden

2.1 Konstruktion Hexahistidyl-markierter (p)LHCP-Klone

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden mit rekombinanten Lichtsammelproteinen durchgeführt. Diese unterscheiden sich neben ihrem Synthesort (Bakterien) auch in ihrer Primärstruktur von den murenen Pflanzenproteinen. Gene, die für pflanzliche Lichtsammelproteine (LHCP) codieren und sich bereits in bakteriellen Expressionsvektoren befanden, wurden hier mit Hilfe von Klonierungstechniken so verändert, daß sie zusätzlich zum Lichtsammelprotein für sechs Histidin-Reste codieren. Gegenüber einer chemischen Markierung, die nach der Proteinsynthese am Protein angebracht wird, hat eine genetisch determinierte Proteinmarkierung Vorteile: Sie ist zum einen hochspezifisch (Lage der Markierung) und zum anderen tragen alle synthetisierten Proteine die Markierung. Hexahistidyl-markierte Proteine können mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden (siehe Kapitel 2.2.6.2).

Plasmide, die das *cab*-Gen AB 80 tragen (zu den Vektoren siehe auch Kapitel 2.2.1), und entweder für das Precursorprotein pLhcb1 (Klon 1n.1, bzw. XLHCP-2, Paulsen *et al.*, 1990) oder das mature Protein (D7f.3, Dilly-Hartwig *et al.*, 1998) codieren, wurden mit Hilfe der ortsgerichteten Mutagenese modifiziert. Diese Methode eignet sich dazu, mittels PCR-Technik spezifische DNA-Abschnitte gleichzeitig zu amplifizieren und zu verändern. Die hier in der PCR verwendeten Primer wurden so ausgewählt, daß eine neue Restriktionsschnittstelle auf dem gewünschten DNA-Abschnitt generiert wurde. Diese Restriktionsschnittstelle wurde dazu verwendet, ein synthetisches DNA-Fragment mit sechs Histidin-Codons in das *cab*-Gen einzuführen (siehe auch Kapitel 2.1.4). Die auf diese Weise veränderten Plasmide wurden in *Escherichia coli* Stämme (JM101 oder SCS 110) transformiert (siehe Kapitel 2.1.12). Der Stamm SCS 110 unterscheidet sich von Stamm JM 101 unter anderem durch das Fehlen von DNA-methylierenden Enzymen (*Dam*: DNA-Adenin-Methylierung, sowie *Dcm*: DNA-Cytosin-Methylierung. Wurde mit Restriktionsenzymen gearbeitet, die methylierte DNA nicht restringieren können, so wurden die Plasmide in diesen Stamm transformiert.

Genotypen der verwendeten *Escherichia coli*-Stämme:

JM 101: *supE, thi-1, Δ(lac-proAB)[F' traD36, proAB, lacI^q, ZΔM15]*
 SCS 110: *rpsL, (Str^r), thr, leu, endA, thi, lacY, galK, galT, ara, tonA, tsx, dam, dcm, supE44, Δ(lac-proAB)][F' traD36, proAB, lacI^q, ZΔM15]*

Folgende Klone wurden hergestellt:

An Position Val²²⁹, des Klons 1n.1 wurde eine *XmaI* Restriktionsschnittstelle eingeführt. In diese C-terminale Position des neuen Klons, C1.1*Xma*, wurde ein Oligonukleotid-Paar kloniert, das für eine Hexahistidyl-Verlängerung codiert. Es wurden zwei Varianten kloniert: Klon C2.4h und C2.4Eh. Sie unterscheiden sich in ihrer Primärstruktur dahingehend, daß Klon C2.4Eh N-terminal der Histidincodons für drei weitere Aminosäuren codiert. Diese

Aminosäuren gehören zu einem Epitop (RGSH₆), das dazu dient, das Protein mit bestimmten Antikörpern (^{RGS}His-Antibody, Qiagen, Hilden) zu detektieren.

Die zu C2.4h und C2.4Eh korrespondierenden muren Klone (C3.2h und C3.2Eh) wurden konstruiert, indem das 5' DNA-Fragment des Transitsequenz-tragenden Gens mit *EcoRI* und *BstEII* herausgeschnitten und gegen das für den muren N-Terminus codierende *EcoRI*-*BstEII*-Fragment ausgetauscht wurde.

Mit den Klonen D7f.3 und C3.2h wurden weitere mature Hexahistidyl-Klone erstellt: Klon D7PH11, der die His₆-Markierung C-terminal von Alanin⁵³ trägt wurde erstellt, indem am entsprechenden DNA-Abschnitt ein Hexahistidyl-Oligonukleotid-Paar in die *PvuII*-Stelle des Ausgangs-Klons D7PvuII2 ligiert wurde. Diese Schnittstelle war zuvor mit einem Mutagenese-Primer generiert worden. Klon D7AH2, der C-terminal von Prolin¹⁴⁷ ebenfalls His₆-verlängert ist, wurde mit dem Ausgangsklon D7ApaI2 erstellt. Die dazu notwendige *ApaI*-Restriktionsschnittstelle wurde ebenfalls mit einem Mutagenese-Primer generiert. Klon 44C.3 wurde durch Ligation des *BamHI*-*PstI*-Fragments in den Expressionsvektor pQE-30 (Qiagen, Hilden) konstruiert, der mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten wurde. Dieses Fragment enthält die codierende Sequenz für das pLHCP-Apoprotein. Der Klon exprimiert ein Protein mit einem Hexahistidyl-Rest am N-Terminus, und stand im Labor bereits zur Verfügung. Die Konstruktion des verwendeten Klons WY16,17AV, einer Trimerisierungs-Mutante, ist bereits beschrieben (Hobe *et al.*, 1995).

Klon neu	Proteintyp	DNA-Ebene	Ausgangsklone	Proteintyp
C1.1Xma	pLHCP wie 1n.1	<i>XmaI</i> -Stelle am C-Terminus, Position 799-804 (G231)	1n.1	pLHCP
C2.4h	pLHCP-(H) ₆ -COO	(H) ₆ in <i>XmaI</i> -Stelle, Position 807 (K232)	C1.1Xma	pLHCP
C2.4Eh	pLHCP-RGS(H) ₆ -COO	RGS(H) ₆ in <i>XmaI</i> -Stelle, Position 804 (ΔK232)	C1.1Xma	pLHCP
C3.2h	LHCP-RGS(H) ₆ -COO	5': D7f.3 (<i>EcoRI</i> / <i>BstEII</i>), 447 bp 3': C2.4h (<i>EcoRI</i> / <i>BstEII</i>), 3824 bp	D7f.3 und C2.4h	D7f.3 und C2.4h N-Terminus: D7f.3, LHCP C-Terminus :C2.4h
C3.2Eh	LHCP-(H) ₆ -COO	5': D7f.3 (<i>EcoRI</i> / <i>BstEII</i>), 447 bp 3': C2.4Eh (<i>EcoRI</i> / <i>BstEII</i>), 3830 bp	D7f.3 und C2.4h	D7f.3 und C2.4Eh N-Terminus: D7f.3, LHCP C-Terminus :C2.4Eh
D7ApaI3	LHCP nativ, matur	<i>ApaI</i> -Stelle im stromalen Loop, Position 547-552 (P147)	D7f.3 (C32h für PCR-Mutagenese)	LHCP
D7PvuII	LHCP nativ, matur	<i>PvuII</i> -Stelle N-terminal des 1. TMH, Position 266-271 (S52)	D7f.3 (C32h für PCR-Mutagenese)	LHCP
D7AH2	LHCP-interne His ₆ -Sequenz	(H) ₆ in <i>ApaI</i> -Stelle, Position 551 (P147)	D7ApaI3	LHCP
D7PH11	LHCP-interne His ₆ -Sequenz	(H) ₆ in <i>PvuII</i> -Stelle, Position 268 (A53)	D7PvuII	LHCP
44C.3	N-(H) ₆ -LHCP	(H) ₆ in Vektor nach ATG-Startcodon	1n.1	LHCP

Tabelle 1.2.2-1 LHCP-Konstrukte in Expressionsvektoren LHCP = Lichtsammelerprotein; pLHCP = Lichtsammelerprotein mit Transitpeptid; (H)₆-COO = Hexahistidyl-Rest am C-Terminus; N-(H)₆ = Hexahistidyl-Rest am N-Terminus; TMH = Transmembran-Helix

2.1.1 Anzucht von Bakterien

Alle Lösungen und Medien, die für molekularbiologische Arbeiten benutzt wurden, wurden sterilisiert (Autoklav, Sterilfilter). Die Bakterien wurden, als Flüssig- oder Plattenkultur angezogen. Plattenkulturen dienten zum Vereinzeln von Bakterien, z.B. nach einer Transformation (siehe Kapitel 1.1.1.1), Flüssigkulturen wurden dann verwendet, wenn Plasmide oder Proteine isoliert wurden (siehe Kapitel 2.1.2 und 2.2.1, siehe auch Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1995).

Material:

LB-Medium / LB-Platten

Trypton	1	%
Hefeextrakt	0,5	%
NaCl	1	%

Das Medium wurde mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt, auf das Endvolumen aufgefüllt und anschließend autoklaviert. Agar-Platten wurden hergestellt, indem dem Medium vor der Sterilisation 1,5 % Agar zugefügt wurde. Das Antibiotikum wurde dann zugegeben, wenn das Medium auf etwa 50 °C abgekühlt war (LB-Amp-Medium / LB-Amp-Platten).

Ampicillin-Stammlösung

			Endkonzentration im LB-Medium
Ampicillin	100	mg/ml	0,1 mg/ml

2.1.2 Plasmid-Isolation aus Bakterien

Zur Plasmid-Isolation aus Bakterien standen verschiedene Methoden zur Verfügung. Diese wurden je nach Anforderung an die DNA-Quantität, -Qualität, sowie den zeitlichen Aufwand ausgewählt. Die Methode von He (He, *et al.*, 1989) eignete sich dazu, Plasmide einer größeren Anzahl von Klonen schnell und kostengünstig zu isolieren. Plasmid-Kits wurden dann verwendet, wenn DNA mit hohem Reinheitsgrad (Mini-Präparationen, Macherey und Nagel) bzw. in größeren Mengen (Midi-Präparation, Genomed) notwendig war.

2.1.2.1 Plasmid-Isolation nach He

Eine der ersten veröffentlichten Methoden, die auf der Basis der Phenolextraktion beruhen (Kirby, 1956), um Nukleinsäure-Extrakte ohne störende Proteine zu gewinnen, wurde hier in einer modifizierten Form angewandt (He, *et al.*, 1989). Die Prozedur basiert darauf, daß Proteine durch organische Verbindungen denaturiert und präzipitiert werden können, ohne daß die Löslichkeit der Nukleinsäuren beeinflusst wird (Jones *et al.*, 1994). Die Isolation der DNA erfolgt mit einem 2-Phasensystem. Die DNA verbleibt dabei in der in der wässrigen Pufferphase und kann von Zellproteinen und lipidhaltigen Zellbestandteilen mit einer zweiten Phase, einem Gemisch aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol abgetrennt werden.

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden zweimal 1,5 ml Bakterienkultur zentrifugiert. Das Bakterien-Pellet wurde in 200 µl HE-Puffer resuspendiert mit 200 µl Phenol-Mix versetzt und

15 sec gevortext. Dabei denaturieren die Proteine, die Lipide lösen sich in der organischen Phase. Zur schnellen Phasentrennung wurde die Probe 2 min zentrifugiert. Die Proteine bildeten dabei eine Interphase zwischen der unteren organischen und der DNA-haltigen, wäßrigen Oberphase. Die Oberphase wurde abgenommen, mit 400 µl eiskaltem 100 %-igem Ethanol gemischt und gefällt. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation (max. g, 4°C, Eppifuge) erhielt man ein DNA-Pellet, das anschließend gewaschen, getrocknet und in Puffer aufgenommen wurde (Kapitel 2.1.3).

Material:

He-Puffer

LiCl	2,5	M,
Tris-HCl (pH 8)	50	mM
TritonX-100	4	%
EDTA	62,5	mM

Phenol-Mix (Die Lösung wurde mit ca. 50 ml TE-Puffer gesättigt.)

	Endkonzentration			für 500 ml Lösung	
Phenol	50	%	(w/v)	250	g
Chloroform	48	%	(v/v)	240	ml
Isoamylalkohol	2	%	(v/v)	10	ml

2.1.2.2 Plasmid-Isolation mit Alkali/SDS-Lyse und Anionen-Austauscher-Säulen

Zunächst werden bei der alkalischen Lyse die Zellbestandteile denaturiert. Im darauffolgenden Neutralisationsschritt renaturieren kleine, kompakte Nukleinsäuren und werden wieder in Lösung gebracht. Die Plasmid-DNA wird daraufhin weiter gereinigt, indem sie an eine mit Diethylaminoethyl (DEAE) gekoppelte Silikamatrix gebunden und im leicht sauren Milieu (pH 5-6) bei steigendem Salzgehalt (ca. 0,6-1 M NaCl bzw. KCl) gewaschen wird. Die Elution der DNA erfolgt mit einem Hochsalz-Puffer (ca. 1-1,5 M NaCl bzw. KCl) um pH 8-8,5. Die DNA wird schließlich gefällt (0,7 Vol Isopropanol), gewaschen und in Puffer aufgenommen, wie in (Kapitel 2.1.3) beschrieben. (Siehe dazu auch die Angaben der einzelnen Hersteller)

Die zu erzielenden Ausbeuten für Plasmide mit geringer Kopienzahl wurden für Minipräparationen mit Nucleobond AX 20 auf 3-20 µg Plasmid/3-10 ml Kultur angegeben, für Midipräparation mit Jet-Star bis zu 100 µg Plasmid/100 ml Kultur. In den Versuchen wurden 25 ml bzw. 100 ml Bakterienkultur eingesetzt. Die tatsächliche Ausbeute bewegte sich zwischen 10 und 15 µg DNA pro 25 ml Kultur nach Minipräparation und ca. 100 µg /100 ml Kultur nach Midipräparation

Material:

Kits: Nucleobond AX (Macherey-Nagel), Jet-Star (Genomed)

Isopropanol 100 % .

Ethanol 70 %

2.1.3 Fällung von DNA

Nukleinsäuren können konzentriert und aufgereinigt werden, indem man sie fällt. Die einfachste Methode DNA zu fällen ist, ihr mit Alkohol das Wasser zu entziehen (0,7-1 Vol Isopropanol, bzw. 2-2,5 Vol Ethanol, absolut und p.A.- Qualität). Es werden weiterhin monovalente Kationen im sauren Milieu zugegeben (3 M Na-Acetat, pH 5-5,2).

In der Regel wurde die DNA 1-2 h gefällt, anschließend zentrifugiert (15-30 min, 4 °C, mind. 10.000 x g) und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde zunächst mit 70 % Ethanol, dann mit 100 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde meist in TE-Puffer gelöst und bei -20 °C aufbewahrt. Sollte die DNA mit solchen Enzymen weiter behandelt werden, die von 2-wertigen Ionen abhängig sind, so wurde das Pellet lediglich in 10 mM Tris-HCl, pH 8 aufgenommen.

Material:TE-Puffer

Tris-HCl, pH 8 10 mM

EDTA 10 mM

Ethanol; Isopropanol; 3 M Na-Acetat, pH 5,2; 10 mM Tris-HCl, pH 8

2.1.4 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese wurde nach Chen und Przybyla, 1994, durchgeführt. Dazu werden zwei Primer (P1, P2) benötigt, die den zu mutierenden DNA-Abschnitt (x) und in 5'-Richtung flankieren. Zwischen Primer und zu mutierender Sequenz sollte je eine Restriktionsschnittstelle (R1, R2) liegen, die nur einmal im Vektor vorhanden ist. Schließlich wird ein Mutagenese-Primer (P_M) benötigt, der die veränderte(n) Base(n) trägt. Zur Amplifikation wird pfu-Polymerase verwendet, da sie keine 3'-Transferase-Aktivität besitzt, eine hohe Polymerisations- und eine niedrige Fehlerrate aufweist. Die erste Amplifikationsrunde wird mit dem Mutagenese-Primer (P_M) und einem der beiden flankierenden Primer (R1 oder R2) durchgeführt. Die Primer müssen dabei an jeweils einem der einander komplementären DNA-Stränge hybridisieren (-/+ - Primer). In der zweiten Runde wird das erste PCR-Produkt direkt als Primer eingesetzt. Da es sich hierbei um doppelsträngige DNA handelt, muß dieser Primer vor der Reaktion denaturiert werden. Außerdem kommt jetzt der zweite flankierende Primer in der PCR zum Einsatz. Das Amplifikationsprodukt wird elektrophoretisch aufgereinigt und aus dem Gel eluiert (siehe Kapitel 2.1.8). Schließlich wird das PCR-Produkt mit den beiden Restriktionsenzymen geschnitten und in das Original-Plasmid

ligiert, das zuvor mit den gleichen Enzymen restringiert und gelelektrophoretisch aufgereinigt worden ist (siehe Kapitel 2.1.8)

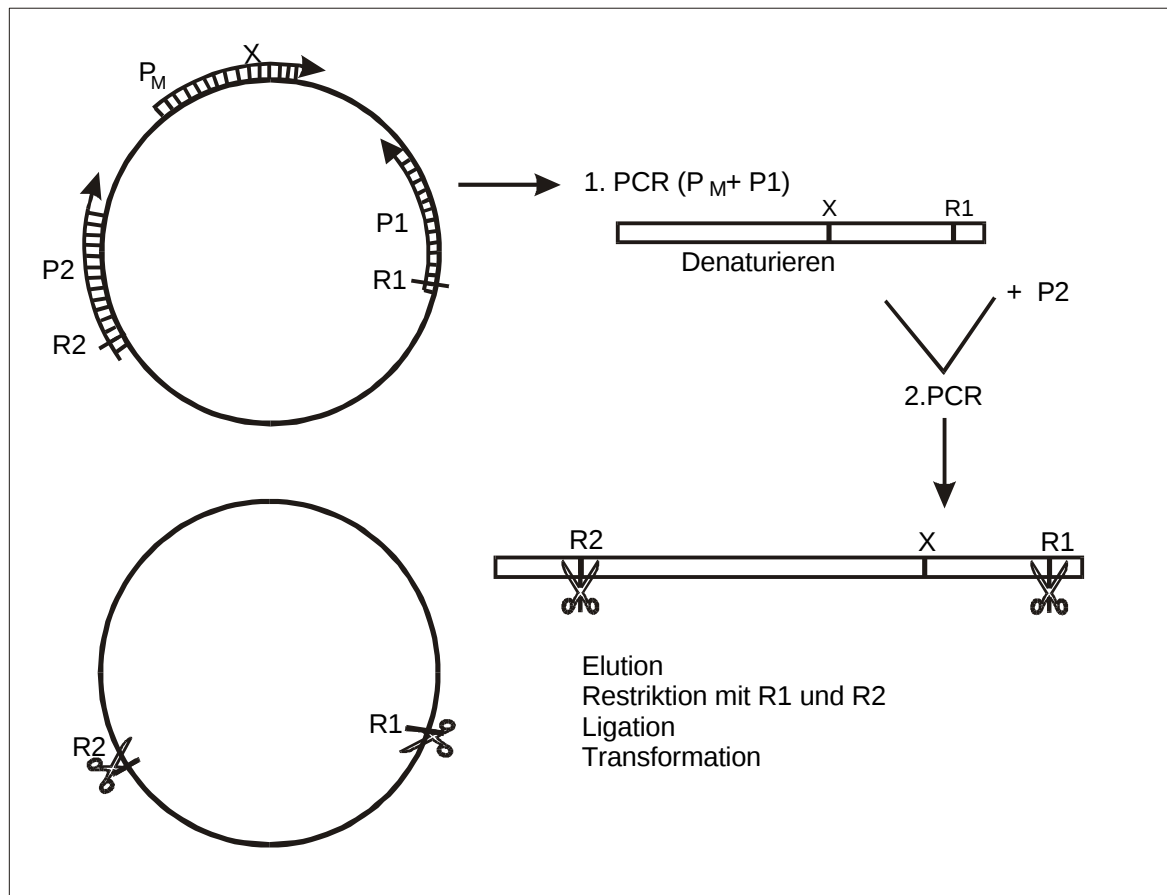


Abbildung 2.1.4-1 Prinzip der ortsgerichteten Mutagenese (verändert nach Chen und Przybyla, 1994). P: Primer; R= Restriktionsschnittstelle; x= zu mutierende Basensequenz. Siehe auch 2.1.4.

Zunächst wurden die PCR-Ansätze ohne Polymerase 10 min bei 95 °C denaturiert, schnell abgekühlt und bei 4 °C zentrifugiert. Dann erst wurde die pfu-Polymerase zugegeben. Der Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet, noch einmal kurz zentrifugiert und die PCR-Reaktion wurde gestartet. Das Mineralöl konnte zum Schluß mit einer Pipette abgenommen werden, nachdem die wäßrige Probe bei -20 °C eingefroren war.

Parameter der PCR-Runden:
1. PCR-Reaktion: (100 µl)

Vektor-DNA	10 ng
Primer	je 50 pmol
dNTP	200 µM
10 x pfu-Puffer	1 x
pfu-Polymerase	2,5 U

25 Zyklen

30 sec Denaturieren	95 °C
30 sec Annealen	45 °C
45 sec Polymerisieren	72 °C

2. PCR-Reaktion: (100 µl)

Vektor-DNA	10 ng
Primer	je 50 pmol
1. PCR-Produkt	6-10 %
dNTP	200 µM
10 x pfu-Puffer	1 x

30 Zyklen

1 Min, 30 sec Denaturieren	95 °C
55 sec Annealen	55 °C
45 sec Polymerisieren	72 °C

Material:

Pfu-Polymerase, (Stratagene, Heidelberg)

pfu-Polymerase 2,5 U

10 x Puffer:

KCl	100	mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	100	mM
Tris-HCl(pH 8,75)	200	mM
MgSO ₄	20	mM
Triton X-100	1	%
BSA	1	mg/ml

2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

In Agarose-Gelen können Nukleinsäuren ihrer Größe nach aufgetrennt und als scharfe Banden fokussiert werden, da sich Ladung und Masse bei einem pH-Wert > pH 5 proportional zueinander verhalten. DNA wurde in Agarose-Gelen zu verschiedenen Zwecken aufgetrennt: Zum einen wurde nach einer Plasmid-Isolation oder einer PCR die Qualität der DNA überprüft. Zum anderen wurde die Elektrophorese dazu benutzt, DNA-Mengen abzuschätzen oder um DNA-Fragmente einer bestimmten Größe zu isolieren, nachdem ein Fragment-Gemisch aufgetrennt worden war (siehe 2.1). Es wurden, je nach gewünschtem Trennbereich, 1-, bzw. 2%ige Agarose-Gele verwendet. Mit solchen Gelen lassen sich DNA-Fragmente von 300 bp bis zu mehreren 1000 bp trennen. Die entsprechende Menge Agarose wurde mit 1 x TBE-Puffer im Mikrowellenherd aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Die Agarose-Lösung wurde nach Abkühlen auf ca. 50°C in mit Kämme bestückte Gelträger gegossen, oder mit einer Glaspipette auf Glaträgerplatten pipettiert (je 10 ml, Minigele). Nach Erstarren der Agarose konnten die Gele bei 4°C aufbewahrt werden.

Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Kammern bei 60-120 V. Der Laufpuffer (1 x TBE) wurde mit 5 µl/100 ml Ethidiumbromid-Stammlösung versetzt. Ethidiumbromid dient dem Nachweis der Nukleinsäuren. Es interkaliert in Nukleinsäuren und kann auf dem Transilluminator (Gel Doc 1000, BioRad, München) bei 312 nm zur Fluoreszenz-Emission (590 nm) angeregt werden. Die Gele wurden mit der Software "Molecular Analyst" (BioRad, München) dokumentiert. Der Vergleich mit Marker-DNA, wie λ-DNA (*Bst*EII-verdaut) oder φX174-DNA (*Hae*III-verdaut), erlaubte Rückschlüsse auf Fragmentgröße. Wurden definierte Mengen der Marker aufgetragen, so konnte anhand der Fluoreszenz auch die DNA- Menge in einer Bande abgeschätzt werden.

Material:

10 x TBE-Puffer:

	Endkonzentration	Mol [g/mol]	für 1000 ml Lösung
Tris	0,89 M	121,1	108 g
Borsäure	0,89 M	61,8	55 g
EDTA	20 mM	372,24	3,72 g

10 x DYE-Lösung:

	Endkonzentration
Bromphenolblau	0,025 %
Xylencyanol	0,025 %
Glyzerin	50 %
EDTA	10 mM
Tris-HCl, pH 8	50 mM

Ethidiumbromid-Stammlösung (10mg/ml):

0,1 g Ethidiumbromid wurde auf dem Magnetrührer in 10 ml Aqua bidest gelöst. (Ethidiumbromid ist kanzerogen)

Größenstandards λ-DNA, *Bst*EIII-verdaut (Fragmentgrößen [bp]:702, 1264, 1371, 1929, 2323, 3675, 4324, 4822, 5686, 6369, 7242, 8454)
 φX174-DNA, *Hae*III-verdaut (Fragmentgrößen [bp]: 72, 118, 194, 234, 271, 281, 310, 603, 872, 1078, 1353)

Agarose p.A.

2.1.6 DNA-Konzentrationsbestimmung über Absorptionsmessung

Die DNA-Menge wurde photometrisch in Quarzküvetten bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren, bestimmt (Shimadzu MPS 2000).

Umrechnungsfaktor: Extinktion 1 = 50 µg/ml (DNA, doppelsträngig)

Anhand eines Spektrums zwischen 320- und 190 nm wurde die Reinheit der Nukleinsäure-Lösung überprüft. Da die aromatischen Aminosäuren der Proteine ebenfalls im UV-Licht absorbieren und Tryptophan bei 280 nm das höchste Maximum aufweist, wird der Quotient E_{260} / E_{280} als Maß für die Reinheit der Nukleinsäure-Lösung angegeben. Dabei sollte reine DNA-Lösung einen Quotienten von mindestens 1,8 aufweisen.

2.1.7 Restriktion von DNA

Die DNA wurde in der Regel nach Vorschrift der Enzymhersteller (NEB, Schwalbach, bzw. Pharmacia, Freiburg) behandelt. Pro µg DNA wurde ein Unit (U) Enzym eingesetzt. (1U = Menge an Enzym, die benötigt wird, um 1µg DNA in 1 h bei optimaler Temperatur vollständig zu verdauen.)

Enzym	Hersteller	Schnittstelle (5'→3')	Puffer	Temperatur [°C]
<i>ApaI</i>	Pharmacia	GGGCC C	1X OPA	25
<i>BamHI</i>	NEB	G GATCC	NEB BamH1 + 100 µg/ml BSA	37
<i>BclI</i>	Pharmacia	T GATCA	2 x OPA	50
<i>BsmI</i>	NEB	GAATGCN	NEB 2	65
<i>BstEII</i>	NEB	G GTNACC	NEB 3	60
<i>BstYI</i>	NEB	Pu GATCPy	NEB BstY + 100 µg/ml BSA	60
<i>EagI</i>	NEB	CGG CCG	NEB 3	37
<i>EcoRI</i>	Pharmacia	G AATTC	2 x OPA	37
<i>HindIII</i>	Pharmacia	A AGCTT	NEB2	37
<i>NcoI</i>	NEB	C CATGG	2 x OPA/NEB 4	37
<i>PstI</i>	NEB	CTGCA G	1 x OPA/NEB 3	37
<i>PvuII</i>	BRL	CAG CTG	NEB 2	37
<i>SacI</i>	Pharmacia	GAGCT C	1 x OPA	37
<i>ScaI</i>	Pharmacia	TTC GAA	2 x OPA	37
<i>SmaI</i>	Pharmacia	CCC GGG	1 x OPA	30
<i>XbaI</i>	Pharmacia	T CTAGA	1 x OPA	37
<i>XhoI</i>	Pharmacia	C TCGAG	2 x OPA	37
<i>XmaI</i>	NEB	C CCGGG	NEB 1	37

Tabelle 2.1.7-1 Restriktionsenzyme und Verdaubedingungen N= A oder C oder G oder T; Pu = A oder G; Py: C oder T

1 x Puffer:

NEB 1	10 mM Bis-Tris-Propan-HCl (pH 7), 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
NEB 2	50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,9), 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
NEB 3	100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7,9), 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
NEB 4	50 mM KAc, 20 mM Tris-Ac (pH 7,9), 10 mM MgAc, 1 mM DTT
NEB <i>Bam</i> HI	150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,9), 10 mM MgCl ₂ , 1mM DTT
NEB <i>Bst</i> YI	10 mM MgCl ₂ , 10 mM Tris-HCl (pH 7), 1 mM DTT
NEB <i>Sca</i> I	100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
OPA	10 mM Tris-Ac (pH 7.5), 10 mM MgAc, 50 mM KAc (One-Phor-All Buffer Plus)

2.1.8 Agarose-Gel-Extraktion

Die restringierte DNA wurde auf ein Agarose-Gel aufgetragen und aufgetrennt. Außerdem wurde ein Größenmarker (λ -DNA, *Bst*EII-verdaut oder ϕ X174-DNA, *Hae*III-verdaut, siehe Kapitel 1.1.1) aufgetragen mit dem die Fragmentgrößen der Probe bestimmt werden konnte. Das gewünschte Fragment wurde mit einem Skalpell unter der UV-Lampe ausgeschnitten. Die Elution aus dem Gel erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Macherey –Nagel GmbH, Düren bzw. Qiagen GmbH, Hilden). Die DNA wird unter Verwendung chaotropher Salze eine Matrix gebunden und gewaschen. Die Elution kann mit Wasser oder einem Niedrigsalz-Puffer (TE-Puffer oder 10 mM Tris-HCl pH 8) erfolgen.

Die Ausbeute der DNA nach der Gelelution wurde durch das Auftragen eines Aliquots auf ein Agarose-Gel bestimmt.

Material:

1-2% Agarose-Gel

λ -*Bst*EII- bzw., ϕ X174-*Hae*III-Größenstandard

Elutions-Kit (Qiagen, bzw. Macherey und Nagel)

2.1.9 Dephosphorylierung geschnittener Plasmide mit CIP

Calf Intestinal Phosphatase (CIP) entfernt Phosphatgruppen an DNA-5'-Enden. Damit wird die Religierung geschnittener Plasmide verhindert. 1-20 μ g DNA (in NEB-Puffer 1/2/3/4, oder OPA) wurden mit 0,1-0,2 Units Enzym in einem Volumen von 50 μ l über 60 min bei 37°C inkubiert. Die Phosphatase wurde durch Phenol-Extraktion entfernt (siehe 2.1.2.1) und der DNA-haltige Überstand anschließend gefällt (siehe 2.1.3).

Material:

Calf Intestinal Phosphatase (CIP), Pharmacia, Freiburg

NEB-Puffer-1,-2,-3,-4, oder One-Phor-All Buffer Plus

2.1.10 Phosphorylierung von DNA-Enden mit Polynukleotidkinase

Synthetisch werden Oligonukleotiden von 5'- in 3'-Richtung hergestellt. Die 5' Enden werden nach Abspaltung der Schutzgruppe in der Regel nicht phosphoryliert. Für eine Ligation mit dephosphorylierten Vektoren, mußten solche Oligonukleotide daher zunächst phosphoryliert werden. Die DNA-Fragmente wurden dazu mit Polynukleotidkinase und ATP behandelt. In 10 µl-Ansätzen wurden 10 pmol DNA zusammen mit 1 nmol ATP und 2 Units PNK in 1 x PNK-Puffer 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Kinase wurde anschließend durch eine Inkubation bei 65 °C, 1 h inaktiviert. Um die Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide (die gemeinsam phosphoryliert worden sind) zu begünstigen, wurde die Probe langsam abgekühlt.

Material:

T4-Polynukleotidkinase (PNK), NEB, Schwalbach/Taunus

10 x PNK-Puffer

Tris-HCl, pH 7,6	700	mM
MgCl ₂	100	mM
DTT	50	mM
ATP-Stammlösung	10	mM

2.1.11 Ligation von Inserts und Vektoren

Bei manchen Vektoren liegt die Klonierungsstelle für Fremd-DNA (Insert) in einem codierenden, nicht essentiellen Gen. Der durch die eingeführte DNA induzierte Ausfall des Genproduktes kann dann phänotypisch nachgewiesen werden (z.B. der Ausfall der β -Galaktosidase mit dem Farbstoff X-gal).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Plasmiden gearbeitet, die das Fremdgen (Lhcb-Gen) bereits enthielten. Da innerhalb des Gens nur einzelne Sequenzabschnitte durch veränderte ersetzt wurden, mußte der Nachweis der Ligation auf andere Weise erfolgen (Restriktionsverhalten der DNA, siehe 2.1.7, Proteinchemischer Hexahistidyl-Nachweis siehe 2.2.6.2, Sequenzierung durch ein Sequenzierlabor (Genterprise, Mainz).

Die Ligation von Oligonukleotiden mit Vektor-DNA erfolgte in 10 µl-Ansätzen, mit 50 - 200 ng Vektor-DNA. Die Oligos wurden jeweils in einem molaren Verhältnis von 2:1 (Oligo:Vektor) eingesetzt. Bei Ligationen (bereits phosphorylierte Oligonukleotide) wurden die Oligonukleotidpaare zuvor unter Hybridisierungsbedingungen inkubiert. Dazu wurden die Oligonukleotide 5 Min in 1 x Ligationspuffer bei 70 °C inkubiert, dann sehr langsam wieder abgekühlt (innerhalb von ca. 4 h) und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Die Ligations-Ansätze aus 1 x Ligase-Puffer, T4-DNA-Ligase (ca.1-2 Weiss Units), ATP und DNA wurden gut gemischt, mindestens 2 h bei 14 °C bzw. üN bei 4 °C inkubiert und am nächsten Morgen transformiert (siehe 2.1.12). Als Maß für die Häufigkeit der Religation wurde neben dem eigentlichen Ligations-Ansatz eine Kontrollprobe ohne Zugabe von Insert angesetzt. Die Anzahl der transformierten Klone auf der Kontrollplatte konnte nach Ausplattieren der Zellen

Auskunft über die Häufigkeit religierter Plasmide geben. Eine weitere Transformation von ungeschnittenen Plasmiden bekannter Menge diente als Kontrolle für die Transformations-Effizienz (siehe auch 1.1.1.1).

Material:

T4 DNA Ligase, NEB, Schwalbach

10 x Ligations-Puffer (cohesive ends):

Tris-HCl, pH 7,5	0,5	M
MgCl ₂	0,1	M
DTT	0,1	M
Spermidin	10	mM
ATP	10	mM
BSA	1	mg/ml

10 x Ligations-Puffer (blunt ends):

Tris-HCl, pH 7,5	0,5	M
MgCl ₂	0,05	M
DTT	0,05	M
Spermidin	5	mM
ATP	0,5	mM
BSA	1	mg/ml

Da ATP instabil ist wurde die Stammlösung ohne ATP angesetzt und bei -20 °C aufbewahrt. ATP wurde dem Ligations-Ansatz direkt zugegeben.

2.1.12 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

Transformationskompetente *E. coli*-Zellen können aufgrund einer erhöhten Membran-Permeabilität erleichtert Fremd-DNA aufnehmen. Eine gängige Methode Transformationskompetente Zellen herzustellen, besteht darin, Bakterien mit hohen Calcium-Konzentrationen auf Eis zu inkubieren. Die Aufnahme der DNA soll durch einen Hitzeschock erleichtert werden. (siehe Kapitel 2.1.12.1 und 1.1.1.1).

2.1.12.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen nach Mike Scott

Der gewünschte Bakterienstamm wurde üN auf LB-Platten supplementiert mit 10 mM MgCl₂ (siehe auch 2.1.1) angezogen. Am nächsten Tag wurden 5 ml TYM-Medium mit einem Klon angeimpft und für 2 h bei 37 °C bebrütet (100 ml-Kolben, 300 rpm, Inkubationsschüttler, Certomat, Braun, Melsungen). Die Zellen wurden dann in 100 ml frisches TYM-Medium überführt und weitere 2-3 h geschüttelt (bis OD₅₅₀ ca. 0,9). Nachdem die Zellen schonend pelletiert (ca. 3000 rpm, 10-12 min) und der Überstand verworfen war, wurden die Bakterien in kalter TfbI-Lösung (30-40 ml/100 ml Starterkultur) resuspendiert und auf Eis inkubiert (JM101- bzw. SCS110-Zellen für 20 min). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (ca. 3000 rpm, 8 min, 4 °C), wurden die Zellen vorsichtig in kalter TfbII-Lösung resuspendiert, in 1 ml-Portionen aliquotiert und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

Material:TYM-Medium

Bacto-Trypton	2	%
Hefeextrakt	0,5	%
NaCl	0,1	M
MgCl ₂ (oder MgSO ₄)	0,01	M

Das Medium wurde mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt.

Tfbl-Lösung

K-Acetat	30	mM
MnCl ₂	50	mM
KCl	100	mM
CaCl ₂	10	mM
Glyzerin	15%	(w/v)

TfbII-Lösung

Na-MOPS, pH 7,0	10	mM
CaCl ₂	75	mM
KCl	10	mM
Glyzerin	15%	(w/v)

2.1.12.2 Transformation

In der Regel tragen Vektoren für die Selektion transformierter Klone sogenannte Markergene. In vielen Fällen dient ein Antibiotika-Resistenzgen als Transformations-Kontrolle. Die hier verwendeten pDS-Vektoren codieren ein Ampicillin-Resistenzgen (β -Lactamase). Nur transformierte Bakterien wachsen auf Ampicillin-haltigen Platten schnell zu Kolonien heran. Erst nach längerer Bebrütung tauchen auch sogenannte Satellitenkulturen auf. Dabei handelt es sich um langsamer wachsende, nicht resistente Zellen, die erst nach einiger Zeit davon profitieren können, daß die Umgebung allmählich von den resistenten Bakterien durch deren β – Lactamase detoxifiziert wird. Um einen Anhaltspunkt für die Transformations-Effizienz zu erhalten (Kompetenz der Zellen), wurde ein ungeschnittenes Kontroll-Plasmid transformiert, das im Durchschnitt etwa 10^7 Klone/ μ g transformierter DNA liefern sollte.

Kompetente Zellen (siehe 2.1.12.1) wurden etwa 30 min auf Eis aufgetaut, leicht gevortext und in 50 μ l-Portionen aufgeteilt. Dann wurden etwa 50 bis 100 ng Vektor-DNA eines Ligations-Ansatzes, bzw. 100 pg–10 ng Plasmid ungeschnittener Vektor (1n.1) zu den Zellen gegeben und mit einer gelben Spitze vorsichtig gemischt. Bei der Transformation in JM 101-Zellen wurden die Zellen 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen sollten dabei nicht mehr bewegt werden. Die Zellen wurden dann einem Hitzeschock ausgesetzt (JM101-Zellen: 5 min, 22 °C) Anschließend wurden 450 μ l LB-Medium (siehe 2.1.1, auf 37 °C vorgewärmt) zugegeben und die Zellen wurden 1 h im Brutschrank inkubiert. Dabei sollten die Zellen eine Teilungsrunde durchführen, und regenerieren können. Ein Aliquot, in der Regel 200 μ l, wurde auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Die Anzahl der Klone auf den Kontroll- und Ligations-Platten wurde bestimmt. Nur wenn die Anzahl der Klone auf der Ligations-Platte die Anzahl der Klone auf der Kontrollplatte um mindestens 10 % übertraf, wurden Klone gepickt und auf LB-Amp-Platten ausgestrichen, um sie weiter zu charakterisieren.

Material:

Kompetente Bakterienzellen (JM 101 oder SCS 110, siehe 2.1.12.1)

LB-Medium (siehe 2.1.1)

LB-Amp-Platten (siehe 2.1.1)

DNA (50-100 ng Ligations-Ansatz oder 100 pg-10 ng ungeschnittener Vektor, siehe 2.1.11)

2.2 Proteinchemische Arbeiten

2.2.1 Isolation von Einschlußkörpern aus Bakterien

LHCP kann in *Escherichia coli*-Stämmen (z.B. JM101) überexprimiert werden, die das *cab*-Gen AB80 oder Derivate davon in einem Expressionsvektor der pDS12-Reihe (Bujard *et al.*, 1987) tragen. Das Gen wird von einem starken Phagen-Promotor kontrolliert (P_{N25}, T5-Phage), der unter der Kontrolle des lac-Operons steht. Die Induktion der Genexpression erfolgt durch Zugabe des nicht metabolisierbaren Galaktose-Analogons IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid).

LHCP wird in überexprimierenden Bakterien in Form von wasserunlöslichen Einschlußkörpern angereichert. Die Proteinpartikel sind gegenüber schwachen Detergentien stabil. Das macht man sich bei ihrer Isolierung zunutze: Man bricht die Bakterienzellen mit Hilfe von Lysozym und schwachen Detergentien (Triton X-100, Desoxycholat) auf, zentrifugiert die Proteinpartikel ab und wäscht sie, indem man mit weiterem schwachen Detergens die Membranreste herauslöst. Auf diese Weise erhält man stark gereinigtes LHCP. Die Reinheit des isolierten LHCP wird in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gel geprüft (siehe Kapitel 2.2.3 und 2.2.4). Das Protein wurde photometrisch quantifiziert (Kapitel 2.2.2).

Je 5 ml LB-Amp-Medium wurden mit dem gewünschten Klon angeimpft und üN inokkuliert (37 °C). Am nächsten morgen wurden 3 ml dieser Vorkultur in 100 ml LB-Amp-Medium überführt. Die Bakterien wurden solange weiter bebrütet (37 °C), bis die Kultur eine optischen Dichte (OD₅₅₀) von 0,5 erreicht hatte (ca. 1h). Daraufhin wurde die Genexpression mit 0,1M IPTG induziert. Die Kultur wurde weitere 4 h bei 37 °C bebrütet. Die Bakterien wurden zentrifugiert (8000 x g, 5 min) und in 800 μ l Lysis-Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 200 μ l Lysozym (Endkonzentration: 4mg/l; 20mg/ml-Stammlösung in Lysis-Puffer, frisch ansetzen), wurden die Bakterien 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Bakterien-DNA mit DNaseI verdaut. Dazu wurden je 10 μ l 1 M MgCl₂ (10 mM Endkonzentration), 1 μ l 1 M MnCl₂ (1 mM Endkonzentration) sowie 10 μ l DNaseI (10 μ g/ml Endkonzentration; 1mg/ml-Stammlösung in DNaseI-Puffer) zur Bakteriensuspension gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Einschlußkörper wie folgt gewaschen:

- * 2 ml Detergens-Puffer zugeben, sehr gut mischen, bis die Suspension nicht mehr schleimig ist.
- * 5 min bei 8000 x g zentrifugieren (4°C), Überstand verwerfen
- * 2 ml Triton-Puffer zugeben, gut resuspendieren (Ultraschall)
- * 5 min bei 8000 x g zentrifugieren (4°C), Überstand verwerfen
- * Triton-Schritt wiederholen, bis Pellet weiß und resuspendierbar ist.
- * 5 min bei 8000 x g zentrifugieren (4°C), Überstand verwerfen
- * Pellet in 2 ml Tris-Puffer resuspendieren
- * 5 min bei 8000 x g zentrifugieren (4°C), Überstand verwerfen
- * Pellet in 500 µl Tris-Puffer resuspendieren.

Die Proteinlösung wurde bei -20 °C aufbewahrt.

Material:

LB-Medium, Ampicillin-Stammlösung; siehe auch Kapitel 2.1.1

1 M MgCl₂, 1M MnCl₂, 1 mg/ml DNaseI, in DNaseI-Puffer, 1 M IPTG

DNaseI-Puffer

Tris-HCl pH 8,0	20	mM
NaCl	50	mM
DTE/DTT	1	mM
BSA	0,1mg/ml	
Glyzerin	50	%

Lysis-Puffer

Tris-HCl, pH 8,0	50	mM
Sucrose	25	%
EDTA (pH 8,0)	1	mM

Detergens-Puffer

Tris-HCl pH 7,5	20	mM
NaCl	200	mM
Desoxycholsäure	1	%
Nonidet P40	1	%
EDTA	2	mM
ß-Mercaptoethanol	10	mM

Triton-Puffer

Tris-HCl, pH 7,5	20	mM
Triton X-100	0,5%(w/v)	
EDTA	1	mM,)
ß-Mercaptoethanol	10	mM

Tris-Puffer

Tris-HCl, pH 8,0	50	mM
EDTA	1	mM
ß-Mercaptoethanol	10	mM

2.2.2 Proteinbestimmung

Proteine mit aromatischen Aminosäuren absorbieren im UV-Bereich um 280 nm. Mit einer bereits erstellten Eichgerade (Hobe, 1995, Dissertation), konnte das Protein relativ genau quantifiziert werden. Gemessen wurde in A₂₈₀-Puffer mit den folgenden Umrechnungsfaktoren:

$$0,1 E_{280 \text{ nm}, 1 \text{ cm}} = 61 \mu\text{g} / \text{ml pLHCP}$$

$$0,1 E_{280 \text{ nm}, 1 \text{ cm}} = 52,5 \mu\text{g} / \text{ml LHCP}$$

Aus der Proteinsuspension wurden je dreimal 10 µl entnommen und in 990 µl A₂₈₀-Puffer 5 min gekocht. Die Referenz (1 ml A₂₈₀-Puffer) wurde ebenfalls gekocht. Es wurde erst gemessen, wenn Referenz und Proben abgekühlt waren.

Material:

A₂₈₀-Puffer

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

2.2.3 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) beruht auf einer Methode von Laemmli, 1970. Polyacrylamid-Gele eignen sich wegen ihrer Stabilität sehr gut dazu, Proteingemische aufzutrennen. Acrylamid und N,N'-Methylen-bisacrylamid polymerisieren hierbei zu einem netzartigen Molekülsieb, wobei die Porengröße durch die Acrylamid-Mengen bestimmt wird. Ammoniumperoxodisulfat (APS, S₂O₈²⁻) bildet in wässriger Lösung Sulfatradikale, die die radikalische Polymerisation des Gels starten. Bisacrylamid wirkt als Quervernetzer der Acrylamidketten. TEMED (Tetramethylethyldiamin) stabilisiert freie Radikale.

$$T = (x + y) \times 100 / V ; C = y \times 100 / (x + y)$$

T = Totale Acrylamid-Konzentration [%]

C = Vernetzungsgrad [%]

x = Masse Acrylamid [g]

y = Masse Methylenbisacrylamid [g]

V = Volumen [ml]

Das Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) löst Proteine und verleiht ihnen gleichzeitig eine stark negative Ladung. Damit wird die Eigenladung des Proteins effektiv überlagert. Die Proteine wandern mit einer Wanderungsgeschwindigkeit, die sich linear zum reziproken Logarithmus ihrer Größe verhält, zur Anode. Ein Sammelgel, das einen pH-Wert von pH 6,8 aufweist, wird dem eigentlichen Trenngel vorgeschaltet, um die Proteine zunächst zu fokussieren. Im Trenngel, das einen pH-Wert von pH 8 aufweist werden die Proteine dann ihrer Größe nach getrennt. Bei einer denaturierenden Gelelektrophorese werden Inter- oder

intramolekulare Disulfidbrücken durch reduzierende Agentien (DTT oder β -Mercaptoethanol) gelöst.

Die Proteine wurden durch 1 min Kochen in 1 x Sparmix denaturiert und nach dem Abkühlen mit einer ausgezogenen Spitze in die Geltasche gefüllt. Mit schwach denaturierenden Gelen konnten ganze Pigment-Protein Komplexe aufgetrennt werden. Die Laufbedingungen wurden hier etwas schonender gewählt (4 °C, 60-100 V, 0,05 % Glycerin im Gel, ohne Sparmix, evtl. Glycerin zum Beschweren, bei Membranen: Solubilisierungspuffer; Kapitel 2.5.3.2). Um Proteine im Molekulargewichtsbereich um 20-30 kDa zu trennen, wurden 12 %- ige Polyacrylamid-Gele verwendet. Wurden höherprozentige Gele verwendet, so ist dies in der Abbildungsbeschriftung angegeben (Kapitel 3).

Material:

Midget- Gele: kleine Kammer (ca. 5 Stck.) (30%T; 1%C)

	(% T)Trenngel				Sammelgel	
Stammlösungen	12	%	15	%	4,5	%
30 % Acrylamid	11,0	ml	13,7	ml	3,0	ml
1 M Tris-HCl pH8,8	11,3	ml	11,3	ml	---	---
1 M Tris-HCl pH6,8	--	--	--	--	2,6	ml
Aqua dest.	5,3	ml	2,6	ml	14,2	ml
Die Lösung vor Zugabe von APS und TEMED zunächst entgasen						
10 % APS	200	μ l	200	μ l	100	μ l
TEMED	13	μ l	13	μ l	10	μ l

Midget-Glycerin-Gele kleine Kammer (ca. 5 Stck.) (30%T; 1%C)

	(% T) Trenngel				Sammelgel	
Stammlösungen	12	%	15	%	4,5	%
30 %Acrylamid	11,0	ml	13,7	ml	3,0	ml
1 M Tris-HCl pH8,8	11,3	ml	11,3	ml	---	---
1 M Tris-HCl pH6,8	--	--	--	--	2,6	ml
80% Glycerin	1,7	ml	1,7	ml	2,5	ml
Aqua dest.	3,6	ml	0,9	ml	11,7	ml
Die Lösung vor Zugabe von APS und TEMED zunächst entgasen						
10 % APS	200	μ l	200	μ l	100	μ l
TEMED	13	μ l	13	μ l	10	μ l

Tabelle 2.2.3-1 Zusammensetzung Midget-Gele Obere Tabelle: Gele für denaturierende Elektrophorese; untere Tabelle: Gele für schwach denaturierende Elektrophorese

1 x SDS-Laufpuffer

	Endkonzentration	M [g/mol]	für 2 l Puffer
Tris	25 mM	121,1	4,84 g
Glyzin	192 mM	75,1	22,53 g
SDS (10 %)	0,01% (w/v)		10 ml
EDTA (0,5M)	0,5 mM	372,24	1 ml

Für schwach denaturierende Gele, die bei 4 °C laufen, wurde das Lithiumsalz des Dodecylsulfats verwendet. Dies hat ein anderes Löslichkeitsprodukt, als das Natriumsalz.

Sparmix

SDS	4	%
β-Mercaptoethanol	1.4	M
Glyzerin	24	%
Tris-HCl, pH 6,8	100	mM
Bromphenolblau	20	mM

2.2.4 Coomassie-Färbung

Proteine lassen sich mit Coomassie-Farbstoff unspezifisch anfärben. Diese Färbemethode zeichnet sich durch einen geringen Arbeitsaufwand aus. Allerdings ist die Sensitivität relativ gering (bis ca. 100 ng Protein bei hier verwendeter "schneller" Coomassie-Methode; vgl. auch Kolloidal-Färbung bis ca. 30 ng, (Westermeier, 1990)). Die Färbeintensität ist von der Hydrophobizität des Proteins abhängig. Daher kann die Färbeintensität verschiedener Proteine, die in gleicher Menge vorliegen unterschiedlich sein.

Zum Färben der Proteine wurde das Gel in einer Gerda-Box mit der Coomassie-Lösung inkubiert (mind. 15 min). Das gefärbte Gel wurde danach für 20 min in 1. Entfärber, dann solange in 2. Entfärber entfärbt, bis die Proteine als blaue Banden erkennbar und der Rest des Gels wieder entfärbt waren. Vor dem Trocknen wurde das Gel gründlich mit Wasser gespült. Die Gele wurden in der Regel zwischen zwei Cellophan-Folien im Geltrockner getrocknet.

Material:Färbelösung (ad H₂O 1000 ml)

Coomassie-Brilliant-Blue			1,75 g
Ethanol	50	%	500 ml
Eisessig	7	%	70 ml
Wasser			430 ml

1. Entfärber (ad H₂O 1000 ml)

Ethanol	20	%	200	ml
Eisessig	7	%	7	ml

2. Entfärber (ad H₂O 1000 ml)

Eisessig	10	%	100	ml
----------	----	---	-----	----

2.2.5 Silberfärbung

Die Silberfärbung beruht auf einer Methode von Merril *et al.*(1981). Vor der eigentlichen Färbung müssen die Proteine zunächst fixiert, die Pufferionen entfernt und die Proteine sensibilisiert werden. Dies geschieht durch verschiedene Fixier- und Waschschrte. Die ablaufenden chemischen Prozesse sind mit den aus der Fotografie bekannten zu vergleichen. Die Silberionen binden komplex an Proteine und werden im alkalischen Milieu durch Formaldehyd zu Silber reduziert. Das Abstoppen geschieht durch ein saures Milieu oder einen Komplexbildner wie EDTA (Häder und Häder, 1993). Die relativ zeitaufwendige Methode ist je nach Färbemethode und Proteintyp 10-20 mal empfindlicher, als die Coomassie-Blau-Färbemethode (Scopes, 1994).

Folgende Schritte wurden allesamt auf einem Schüttler ausgeführt:

Das Gel wurde zunächst mindestens für drei Stunden, besser aber über Nacht, in Fixierlösung I, dann für mindestens zwei Stunden in Fixierlösung II inkubiert. Danach wurde das Gel mit Aqua bidest abgespült und 3 x 20 Minuten in 200-300 ml Aqua bidest gewässert. Das Gel wurde daraufhin für eine Stunde in der Färbelösung gefärbt. Dann wurde zunächst eine geringe Menge Entwickler auf das Gel gegeben, worauf sich sofort ein grauer Niederschlag bildete, der gleich abgesaugt werden mußte. Erst jetzt wurde das Gel vollständig im Entwickler inkubiert. Die Entwicklung selbst dauerte höchstens eine Minute und mußte durch Abstopplösung beendet werden. Anschließend wurde das Gel auf dem Geltrockner getrocknet.

	Endkonzentration		für 400 ml Lösung	
<u>Fixierer I:</u>				
Ethanol (technisch)	30	% (v/v)	120	ml
Eisessig	10	% (v/v)	40	ml

Fixierer II:

Ethanol (technisch)	30	% (v/v)	120	ml
Glutardialdehyd (25 %ig)	0,5	% (v/v)	8	ml
Natriumacetat	0,5	M	16,4	g
Natriumthiosulfat	12	mM	1,26	g

Färbelösung:

Silbernitrat	0,1 % (w/v)	0,4 g
Formaldehyd (37 %ig)	0,01 % (v/v)	108 µl

Entwickler:

Natriumcarbonat	2,5 % (w/v)	10 g
Formaldehyd (37 %ig)	0,01 % (v/v)	108 µl

Abstopplösung:

EDTA	0,05 M	7,45 g
------	--------	--------

Die Lösungen wurden mit Aqua bidest auf ein Endvolumen von 400 ml aufgefüllt.

2.2.6 Western-Blot und Nachweis His₆-markierter Proteine

Die in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine, lassen sich elektrophoretisch auf die Oberfläche von immobilisierenden Trägermembranen, wie Nitrocellulose, oder Polyvinylidenfluorid-Membranen (PVDF) übertragen. Auf der Membran-Oberfläche sind die Proteine besser für großmolekulare Liganden (z.B. Antikörper) zugänglich, als in einem Gel. In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine mit einem Tankblotsystem transferiert.

Material:Western-Blot Puffer (kontinuierliches System)

	Endkonzentration	M [g/mol]	für 2 l Puffer
Tris	20 mM	121,1	4,84 g
Glyzin	150 mM	75,1	22,53 g
SDS (10 %)	0,05% (w/v)		10 ml
Methanol	20% (v/v)		400 ml

Schaumstoff, Filterpapier und Transfermembran wurden in Western-Blot-Puffer äquilibriert und dann in unten genannter Reihenfolge Luftblasen-frei zusammengebaut.

- * schwarze Gitterseite (unten, Kathode, -)
- * Schaumstofflage
- * Filterpapier (ca. 9 x 9 cm, GB002, Schleicher und Schuell, Dassel)
- * Gel
- * Nitrocellulose (Porengröße 0,2 µm)
- * Filterpapier (ca. 9 x 9 cm, GB002, Schleicher und Schuell, Dassel)
- * Schaumstofflage
- * weiße Gitterseite (oben, Anode, +)

Die Transfereinheit wurde mit der weißen Gitterseite nach vorne (Pluspol, rot) in die Blot-Kammer (Tankblot-Kammer, LKB 2051, Pharmacia, Freiburg) eingesetzt. Die Kammer wurde mit kaltem Blot-Puffer gefüllt, so daß die Elektroden bedeckt waren. Der bereits vorgekühlte Puffer wurde während des Blottens weiter gekühlt und ständig mit einem Rührmagneten durchmischt. (Blot-Dauer: 60-90 min, 160 mA)

2.2.6.1 Ponceau S Färbung

Mit dieser reversible und nicht sehr sensitive Färbemethode konnte der Proteintransfers grob überprüft werden. Die geblottete Membran wurde einige Minuten in der Färbelösung inkubiert und danach mit Aqua dest. gespült. Die Proteinbanden traten rot hervor, sobald sich der Hintergrund entfärbte. Die Proteinstandards wurden markiert. Die Färbung verschwand während der weiteren Membran-Behandlung wieder.

Material:

Ponceau S	0,2	% (w/v)	0,2	g
Trichloressigsäure	3	% (w/v)	3	g
Aqua bidest			ad 100	ml

2.2.6.2 Nachweis Hexahistidyl-markierter Proteine

Proteine, die eine Hexahistidyl-Markierung tragen lassen sich auf biochemischem oder immunologischem Weg nachweisen. Die Methoden werden im Folgenden (Kapitel 2.2.6.2.1 und 2.2.6.2.2) einzeln beschrieben.

Vor dem spezifischen Nachweis der Proteine wurden die unbesetzten Bindungsstellen der Membran noch mit Proteinen blockiert, die an der Nachweisreaktion nicht teilnehmen (3% BSA in 1 x TBS, 1 h, RT)

Zur Inkubation mit dem primären Antikörper wurde der Blocking-Puffer mit 1 x TBS-Puffer auf 1,5% BSA verdünnt.

Material:

Blocking-Puffer

	Endkonzentration		für 100 ml Lösung
Rinderserumalbumin (BSA)	3 % (w/v)	3	g
1 x TBS-Puffer pH 7,5		ad 100	ml

2.2.6.2.1 Ni-NTA-AP-Konjugat-Reaktion

Der biochemische Nachweis von Hexahistidyl-Seitenketten beruht darauf, daß Ni-NTA-Konjugate im leicht basischen pH-Bereich mit hoher Affinität an alternierende Histidin-Reste binden. Die Methode beruht also auf der "Immobilized Metal Affinity Adsorption" (IMA, Porath und Ohlin, 1983). Ni^{2+} hat 6 Bindungsstellen. Vier davon werden durch den Chelatbildner Nitrilotriacetsäure (NTA). Damit bleiben zwei Bindungsstellen des Nickels für die reversible Bindung an einen Liganden (Hochuli *et al.*, 1987, siehe Abbildung 2.2.6-1). Deprotonierte Histidin-Reste eignen sich als Liganden; da das freie Elektronenpaar von Histidin als Elektronendonator für das Zentralatom (Ni^{2+}) fungieren kann. Nickel behält durch die Immobilisierung an NTA einerseits seine Affinität zu Histidin, andererseits verhindert die Kopplung an NTA, daß Proteine aggregieren: Freie Nickelionen können mit mehreren Proteinen kreuzverknüpfen, was zu einer Aggregation bzw. Protein-Präzipitation führen würde. NTA ist in diesem Falle noch mit dem Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt. Da das Enzym direkt mit dem NTA gekoppelt ist, können markierte Proteine schnell nachgewiesen werden (siehe Abbildung 2.2.6-2). Nickel-NTA hat allerdings den Nachteil, daß es ebenso mit anderen Metall-bindenden Proteinen reagieren kann (z.B. Proteinstandard: bovine carbonic anhydrase; bindet Zn^{2+}).

Die Detektion erfolgte colorimetrisch mit BCIP/NBT (siehe Kapitel 2.2.6.3).

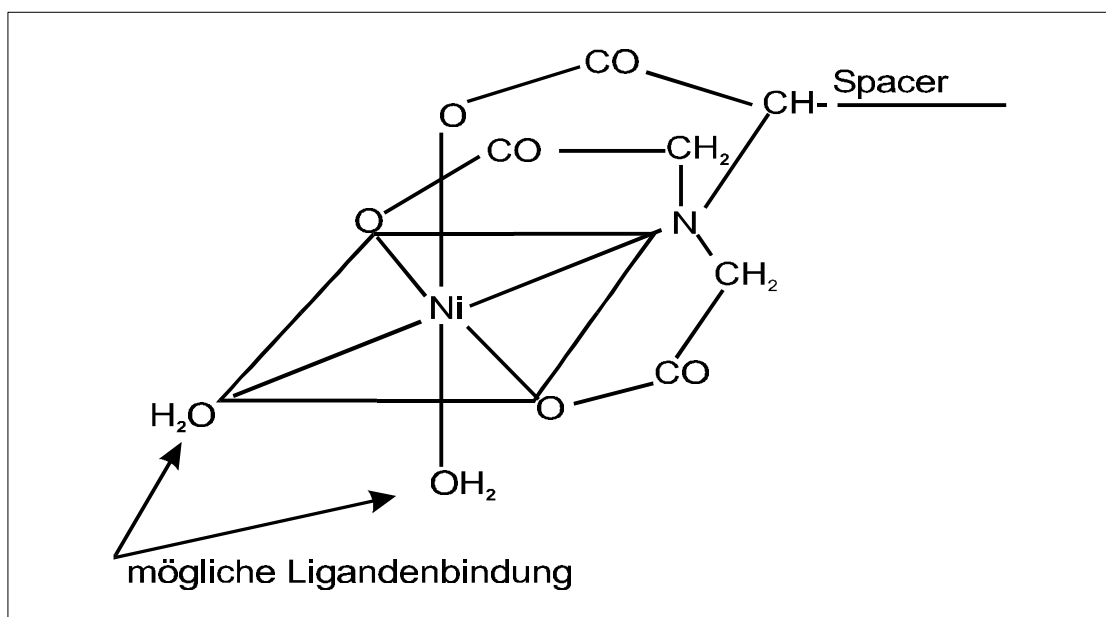


Abbildung 2.2.6-1 Schematische Darstellung der Nickel-Chelatisierung mit NTA

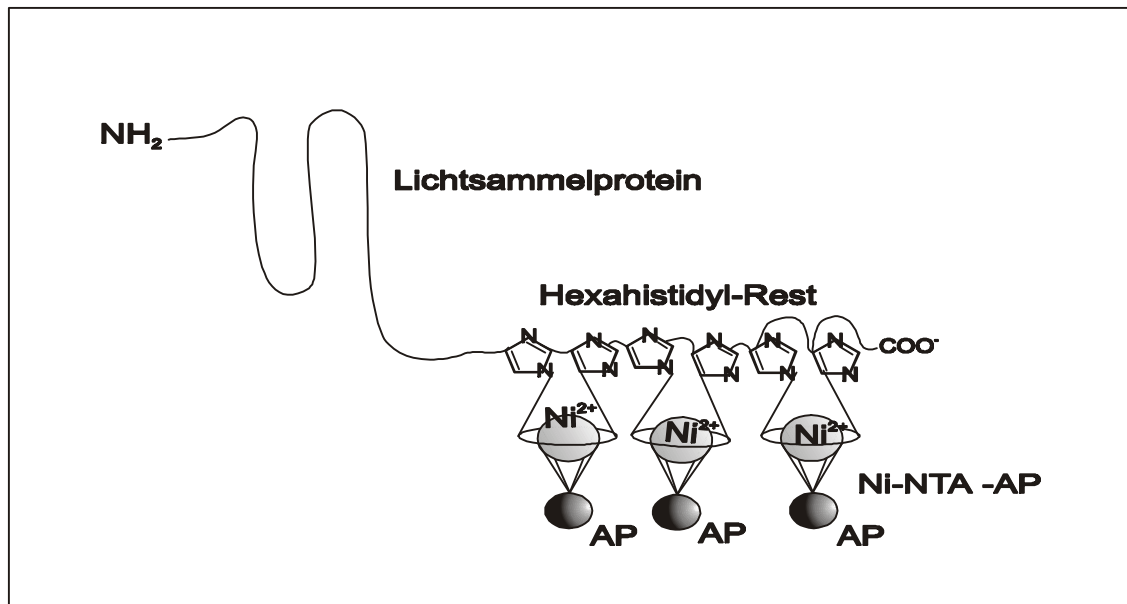


Abbildung 2.2.6-2 Prinzip des Ni-NTA-Nachweises NTA = Nitrilotriessigsäure, AP = Alkalische Phosphatase

Ni-NTA-Konjugat

Nickel-Nitrilotriaceticacid-Alkaline-Phosphatase-Conjugate (Qiagen, Hilden)

Arbeitskonzentration 1: 1000

Sensitivität (W.-Blot) 2-5 ng (lt. Hersteller)

Nach dem Blocken des Blots wurden folgende Wasch- und Inkubationsschritte durchgeführt (Schüttler, RT).

- * Blot mit 1 x TBS abspülen
- * 1 h in Blocking-Lösung inkubieren
- * 3 x 10 min in 1 x TBS-Tween waschen (TBST)
- * 1 h Ni-NTA-AP-Konjugat inkubieren (1:1000 in TBS)
- * 3 x 10 min in 1 x TBS-Tween waschen (TBST)

Detektion: BCIP/NBT (s.o.) in AP-Puffer

2.2.6.2.2 Anti-^{RGS}HIS-Antikörper-Reaktion

Beim immunologischen Nachweis mit Anti-^{RGS}HIS-Antikörpern (Maus Ig G₁, Qiagen, Hilden) bilden die Histidin-Reste einen Teil des Epitops (Arg-Gly-Ser-His-His-His). Ein sekundärer Antikörper dient der Detektion des Proteins. Dieser ist gegen den primären Antikörper gerichtet (Anti-Maus) und zudem an ein Enzym (Alkalische Phosphatase) gekoppelt (siehe Abbildung 2.2.6-3). Vorteil der immunologischen Methode ist, daß keine Kreuzreaktionen des Antikörpers mit anderen Proteinen gibt, da das Epitop mit sechs aufeinanderfolgenden Histidin-Resten, in der Natur wohl nicht vorkommt. Der Nachteil

gegenüber der biochemischen Methode ist der mit primärer und sekundärer Antikörper-Inkubation verbundene größere Zeitaufwand.

In der Arbeit wurde ein Anti-Maus/Alkalische Phosphatase-Konjugat verwendet. Die Detektion erfolgte colorimetrisch mit BCIP/NBT (siehe Kapitel 2.2.6.3).

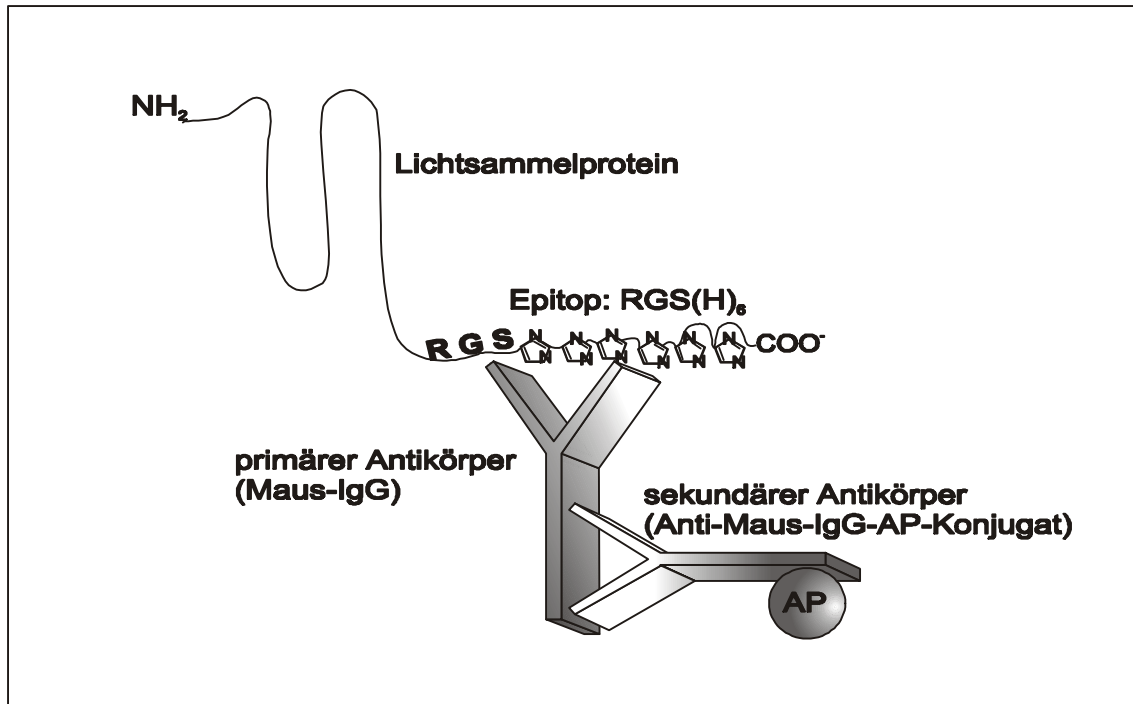


Abbildung 2.2.6-3 Prinzip der Antikörperreaktion AP = Alkalische Phosphatase

^{RGS}His-Antikörper:

^{RGS}His Antibody ,(Qiagen, Hilden)

Arbeitskonzentration 0,1 µg/ ml , 1: 1500

Sensitivität (W.-Blot) 1 ng (lt. Hersteller)

Nach dem Blocken des Blots wurden folgende Wasch- und Inkubationsschritte durchgeführt (Schüttler, RT).

- * Blot mit 1 x TBS abspülen
- * 1 h in Blocking-Lösung inkubieren
- * 2 x 10 min in 1 x TBS-Tween/Triton waschen (TBSTT)
- * 1 x 10 min in 1 x TBS waschen
- * 1 h Anti-^{RGS}HIS-Antikörper inkubieren (1:1500 in ½Blocking-Puffer)
- * 2 x 10 min in 1 x TBS-Tween/Triton waschen (TBSTT)
- * 1 x 10 min in 1 x TBS waschen
- * 1 h Anti-Maus-Antikörper inkubieren (1: 30000 in Blocking-Puffer)
- * 4 x 10 min in 1 x TBS-Tween/Triton waschen (TBSTT)

Detektion: BCIP/NBT

Material:10 x TBS-Puffer

	Endkonzentration	M [g/mol]	ad 1000 ml
NaCl	1,5 M	58,44	8,776 g
Tris-HCl pH 7,5	100 mM	121,1	12,11 g

5 x TBS-Tween/Triton-Puffer (TBSTT)

	Endkonzentration	M [g/mol]	ad 1000 ml
NaCl	2,5 M	58,44	146,1 g
Tween 20	0,25% (v/v)		2,5 ml
Tris-HCl pH 7,5	100 mM	121,1	12,11 g
Triton X-100	1% (v/v)		10 ml

5 x TBS-Tween –Puffer (TBST)

	Endkonzentration	M [g/mol]	ad 1000 ml
NaCl	2,5 M	58,44	146,1 g
Tween 20	0,25% (v/v)		2,5 ml
Tris-HCl pH 7,5	100 mM	121,1	12,11 g

Die Puffer wurden vor Gebrauch mit Aqua dest. auf 1 x Puffer verdünnt.

2.2.6.3 BCIP/NBT-Reaktion

Die Phosphatase-Konjugate (Ni-NTA-AP bzw. Anti-Maus-AP) sollten relativ spezifisch an markierte Proteine binden. Die Alkalische Phosphatase spaltet im basischen Milieu (um pH 9) die Phosphat-Gruppe von BCIP, das dabei oxidiert wird und einen blauen Niederschlag bildet. BCIP wird in Kombination mit NBT verwendet, das im Zuge der Reaktion reduziert wird und ebenfalls einen blauen Niederschlag bildet.

Die Membran (ca. 30 cm²) wurde in 5 ml AP-Puffer, 33 µl NBT und 16,5 µl BCIP eingeschweißt und entwickelt, bis violettblaue Banden sichtbar wurden. Dann wurde die Farbreaktion durch kurzes Waschen der Nitrocellulose in Aqua dest. unterbrochen und die Membran getrocknet.

Material:Alkalische Phosphatase-Färbepuffer (AP-Puffer)

	Endkonzentration	M [g/mol]	ad 1000 ml
NaCl	100 mM	58,44	5,84 g
MgCl ₂ (1M)	5 mM	203,3	5 ml
Tris-HCl pH 9,5	100 mM	121,1	12,1 g

<u>BCIP</u>	Endkonzentration	ad. 2 ml
5-Bromo-4-Chloro-3-Idolyphoshat	5 % (w/v)	0,1 g

BCIP wird in Aqua dest. gelöst und in 0,5 ml Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

<u>NBT</u>	Endkonzentration	ad. 5 ml
Nitroblautetrazoliumchlorid	5 %	0,25 g

NBT wird in 70 % (v/v) Dimethylformamid gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.7 Rekonstitution von LHCII

Bei einer Rekonstitution werden im Prinzip Proteine und Pigmente aus SDS-Mizellen über SDS-Octylglucosid-Mischmizellen in Octylglucosid-Mizellen gezwungen (siehe auch Paulsen *et al.*, 1993). Die Umgebung des Proteins verändert sich, dadurch wird die Faltung des Proteins induziert. Gleichzeitig werden die Pigmente gebunden. Die Rekonstitution bietet damit die Möglichkeit relativ schnell zu überprüfen, ob veränderte Lichtsammelproteine noch die Fähigkeit besitzen, *in-vitro* stabile Pigment-Protein Komplexe auszubilden, d.h., ob sie ihre strukturelle Integrität trotz Hexahistidyl-Markierung aufrecht erhalten haben. Dazu wurde denaturiertes Protein in Gegenwart von 2 % LDS mit einer Pigmentmischung gemischt (ca. 3-5-facher stöchiometrischer Überschuß der Pigmente). Dann wurde mit 1 % Octylglucosid ein nicht-ionisches Detergens zugesetzt. Dodecylsulfat wurde als in der Kälte schwerlösliches Kalium-Salz ausgefällt.

Rekonstitutionen von LHCII sind definiert durch die Konzentration der einzelnen Komponenten:

Standard-Rekonstitution:

0.4 µg/µl	Apoprotein
1.0 µg/µl	Chlorophyll (Chla/Chlb = 1)
0.15 µg/µl	Xanthophyll

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Rekonstitutionen unter den angegebenen Standardbedingungen durchgeführt. Von einer (p)LHCP-Suspension wurden 20 µg gewaschenes und zentrifugiertes Protein eingesetzt und mit 50 µl Solubilisierungspuffer versetzt.

Rekonstitution:

- * 1 min , 100°C
- * + 5 µl 10 mM DTT (nach Abkühlen der Probe!)
- * Proteinlösung zu 5 µl Pigmentmischung in Ethanol (s.o.) pipettieren
- * Sofort kräftig mischen (30 sec auf dem Vortexer)
- * + 7.5 µl 10% OG [=1%OG Endkonzentration]
- * gut mischen
- * 5 min bei RT
- * + 7.5 µl 2 M KCl [=0.2 M KCl Endkonzentration]
- * gut mischen
- * 5 min auf Eis
- * Zentrifugieren: 1 min, 12000 rpm, 4°C
- * Überstand abheben (enthält die Komplexe und ungebundenes Pigment in 1% OG; kann kurz auf Eis, ansonsten bei -20°C gelagert werden.

Unter bestimmten Laufbedingungen können rekonstituierte LHCII von freiem (p)LHCP abgetrennt werden. Rekonstituierte Proteine erscheinen als grüne Banden im Gel. Sie haben außerdem ein anderes Laufverhalten, als die schneller im Gel migrierenden freien Pigmente.

Ein 15µl-Aliquot des Überstands (ca. 6 µg Protein) wurde auf ein schwach denaturierendes Gel aufgetragen (siehe auch Kapitel 2.2.3) . In einer Versuchsvariante wurde der Solubilisierungspuffer mit verschiedenen Nickelmengen versetzt, so daß sich im Rekonstitutionsansatz folgende Endkonzentrationen ergaben: [10µM], [100µM], [1 mM]. Dieser Versuch wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob freie Metallionen, die Rekonstitution der Lichtsammelproteine beeinflussen.

2.3 Radioaktive Markierung von Einschlußkörpern mit [³⁵S]Methionin

2.3.1 Kulturbedingungen

Je 3 ml Minimalmedium wurden mit 3 µl Ampicillin-Stammlösung versetzt und mit dem zu markierenden Stamm angeimpft. Diese Vorkultur wurde dann üN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten morgen wurden je Vorkultur 1,5 ml abzentrifugiert (15800 x g, 30 sec), der Überstand verworfen und das Bakterien-Pellet in 1ml S-Medium gewaschen, um Sulfat aus dem Medium zu entfernen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15800 x g, 30 sec) wurde das Bakterien-Pellet erneut in 1 ml S-Medium aufgenommen und in ein 14 ml Kunststoff-Reagenzgefäß mit Kulturröhrchen-Deckel überführt. Danach erfolgte die Zugabe von 0,1 - 0,2 mCi L-[³⁵S]-Methionin, bzw. einem Gemisch aus radioaktiv markiertem Methionin und Cystein. Schließlich wurden 3 µl 1M IPTG zugegeben (Endkonzentration 3 mM), um die Expression von LHCP zu induzieren. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C im Schüttelwasserbad (Köttermann), wurden 2,5 µl Thiamin (1 mg/ml) zugegeben und weitere 3 h bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert.

Material: Alle Lösungen wurden sterilisiert (Autoklav, Sterilfilter)

Stammlösungen zur Bakterienanzucht

	Endkonzentration	für 100 ml Lösung
<u>Glucose</u>	40 %	40 g

	Endkonzentration	M [g/mol]	für 10 ml Lösung
<u>CaCl₂</u>	1 M	147,02	1,47 g

	Endkonzentration	für 1 ml Lösung
<u>Thiamin</u>	100 mg/ml	0,1 g

	Endkonzentration	M [g/mol]	für 10 ml Lösung
<u>MgSO₄</u>	1 M	346,48	24,6 g

	Endkonzentration	für 1 ml Lösung
<u>Mg-Acetat</u>	500 mg/ml	0,5 g

	Endkonzentration	M [g/mol]	für 10 ml Lösung
<u>Isopropylthiogalaktosid</u>	1 M	238	2,38 g

	Endkonzentration	für 10 ml Lösung
<u>Ampicillin</u>	100 mg/ml	1 g

Zum Lösen des Na-Salzes wurde die Lösung mit NaOH titriert, auf 10 ml aufgefüllt und sterilfiltriert.

10 x Minimalmedium I

	Endkonzentration	für 100 ml Lösung
Na ₂ HPO ₄	6 %	6 g
KH ₂ PO ₄	3 %	3 g
NaCl	0,5 %	0,5 g
NH ₄ Cl	1 %	1 g

Die Lösung wurde auf pH 7,4 eingestellt, auf 100 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und anschließend autoklaviert.

1 x Minimalmedium

	Endkonzentration	für 100 ml 1 x Minimalmedium
10 x Minimalmedium I	1 x	10 ml
H ₂ O (steril)		89,3 ml
MgSO ₄ (1M)	2 mM	0,2 ml
Glucose (40 %)	0,2 %	0,5 ml
CaCl ₂ (1M steril)	0,1 mM	10 µl
Thiamin (100 mg/ml)	2,5 µg/ml	2,5 µl
Ampicillin (100 mg/ml)	0,1mg/ml	100 µl vor Gebrauch zugeben

Salze

	Endkonzentration	für 1000 ml Lösung
KH ₂ PO ₄	0,3 %	3 g
K ₂ HPO ₄	1,12 %	11,2 g
NaCl	0,05 %	0,5 g
NH ₄ Cl	0,1 %	1 g

Die Lösung wurde mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt und anschließend autoklaviert.

Mikrosalze

	Endkonzentration	für 100 ml Lösung
CaCl ₂	0,2 g/l	0,02 g
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,6 g/l	0,06 g

Die Lösung wurde mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt und anschließend autoklaviert.

Aminosäuren (Schwefel-frei)

Für 1 ml Aminosäure-Lösung wurde von allen proteinogenen Aminosäuren, mit Ausnahme von Cystein und Methionin 1 mg eingewogen, auf 1 ml aufgefüllt, sterilfiltriert und bei -20 °C aufbewahrt.

Basen

	Endkonzentration	für 1 ml Lösung
Thymin	1 g/l	1 mg
Adenin	1 g/l	1 mg
Uracil	1 g/l	1 mg

Die Basen wurden in sterilem Aqua dest. gelöst und in 1 ml Aliquots bei -20 °C

S-Medium für 1,5 ml Bakterienkultur

		x 20
Salze	2 ml	40 ml
Mikrosalze	20 µl	400 µl
Glucose (40 %)	40 µl	800 µl
Basen (1mg/ml)	10 µl	200 µl
Aminosäuren (1mg/ml)	80 µl	1,6 ml
Mg-Acetat (500 mg/ml)	0,2 µl	4 µl
Ampicillin (100 mg/ml)	2 µl	40 µl

[³⁵S]-Methionin

RedivueTM, AG1094, oder RedivueTM Promix, AGQ0080, Amersham

2.3.1.1 Isolation der Einschußkörper

Die Isolation der Einschußkörper erfolgte wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben. Sie erfolgte lediglich im kleineren Maßstab, so daß die Menge der eingesetzten Lösungen entsprechend reduziert wurde (s.u.). Die gereinigten Proteine wurden in 100 µl Tris-Puffer aufgenommen und bei -20 °C aufbewahrt. Die Proteinmenge wurde bestimmt, indem ein 3 µl-Aliquot der Proteinsuspension auf einem 12%-igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt wurde. Eine quantifizierte Menge nicht markiertes Protein, sowie ein kommerziell erhältlicher Protein-Marker (SDS7-Marker, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) wurden als Referenz aufgetragen und die Färbeintensitäten miteinander verglichen. Nach dem Entfärben wurde das Gel kurz in Wasser gewaschen, auf Whatman-Papier gelegt, mit Haushaltsfolie abgedeckt und auf dem Gelrockner getrocknet. Das getrocknete Gel wurde anschließend autoradiographisch oder fluorometrisch ausgewertet, um zu überprüfen, ob die Proteine der einzelnen Klone etwa gleich stark markiert worden sind (siehe 2.3.1.2 und 2.3.1.3). Die Bandenintensitäten wurden rein visuell miteinander verglichen. Die genaue Bestimmung der Probenaktivität wurde mit dem Szintillationszähler vorgenommen (2.3.1.4).

Material: (Rezeptangaben siehe Kapitel 2.2.1)

Eingesetzte Mengen pro 1 ml Bakterienkultur:

Lysis-Puffer 160 µl; Lysozym (10 mg/ml in Lysis-Puffer) 40 µl; 1 M MgCl₂ 4µl; 1 M MnCl₂ 0,4 µl; DNaseI (1 mg/ml in DNaseI-Puffer) 5 µl; Detergens-Puffer 500 µl; Triton-Puffer 2 x 500µl; Tris-Puffer 500µl + 100µl zur Aufbewahrung

2.3.1.2 Autoradiographie

Wurde das Gel autoradiographisch ausgewertet, so wurde das Gel nach dem Anfärben in einer Verstärker-Lösung (AmplifyTM, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg) inkubiert. Durch die Konversion schwacher β-Emission in blaue Lichtquanten wird die Detektions-Effizienz mit [³⁵S] um etwa das 15-fache erhöht. Das Gel wurde nach der Inkubation in Entfärber-Lösung ca. 15 min in Aqua dest. gewaschen, anschließend für 20 min in der Verstärker-Lösung inkubiert und dann getrocknet. Die Filmexposition erfolgte in einer Autoradiographiekassette.

2.3.1.3 Fluorometrie

Bei der fluorometrischen Auswertung wird eine wiederverwendbare Bildplatte auf dem Film exponiert. Die Platte ist mit photostimulierbaren Phosphorkristallen beschichtet ((BaF(Br,I):Eu²⁺), die den Sensor für ionisierbare Strahlungsenergie bilden. Die Energie der Probe wird auf die Phosphorkristalle transferiert und in einer Elektronenfalle stabilisiert. Durch das Scannen der Platte mit einem He-Ne-Laser bei 633 nm (Fujifilm, BAS-1800, Raytest, Straubenhardt), erfolgt eine zweite Anregung der Kristalle und die Elektronen werden wieder freigesetzt. Gleichzeitig werden Photonen um 400 nm emittiert. Diese photostimulierbare Blaulicht-Lumineszenz wird detektiert und in ein digitalisiertes Bild umgerechnet. Der Vorteil dieser Detektionsmethode gegenüber der Röntgenfilm-Autoradiographie ist die höhere

Sensitivität (um ca. Faktor 10^2 , laut Hersteller) und die Linearität über einen größeren Dosisbereich (ca. 10^{-1} - 10^4 dpm/mm², laut Hersteller). Weiterhin muß das Gel nicht in Verstärker-Lösung vorinkubiert werden. Diese Methode ist damit nicht nur sensitiver, sondern auch kürzer, als die Autoradiographie.

Das Gel wurde nach der Inkubation in Entfärber-Lösung kurz in Aqua dest. inkubiert und dann getrocknet. Die Exposition mit der Bildplatte erfolgte in einer Autoradiographiekassette bei Raumtemperatur. Beim Öffnen der Kassette wurde in gedämpften Licht gearbeitet, da eine längere Exposition in Weißlicht die Regeneration der lichtempfindlichen Kristalle bewirkt.

2.3.1.4 Aktivitätsbestimmung im Szintillationszähler

3 µl der Proteinsuspension wurden in 3 ml Szintillations-Flüssigkeit (Aquasafe 300) gegeben und gut gemischt. Dann wurde die Probe im Szintillationszähler gemessen. Bei einer Proteinausbeute von ca. 5 µg bis 35 µg pro 1,5 ml S-Medium ergab sich eine Aktivität von etwa 10^6 bis 5×10^6 cpm/µg Protein. Dies erwies sich für die anschließenden Insertionsexperimente als ausreichend. Für einen Insertionsansatz wurden 5×10^5 cpm eingesetzt, d.h. zwischen 100 und 500 ng Protein (min 30 nM bis max. 200 nM Protein im Ansatz bei Molekulargewichten der Proteine zwischen 25-30 kDa).

2.4 Isolation von Chloroplasten, Stroma und Thylakoiden aus jungen Erbsen-Blättern

2.4.1 Pflanzenanzucht

Ausgangsmaterial zur Isolation von Thylakoiden und Stroma waren 7-9 Tage alte Erbsen. Die Erbsensamen (ca. 0,8 kg TG) wurden mindestens 6 h unter Luftzufuhr eingequollen und in Schalen auf Vermiculit (Härte K4, Klein Dämmstoffe, Zellertal) ausgesät. Die Anzucht erfolgte in Klimakonstanträumen oder im Gewächshaus unter zusätzlicher Beleuchtung (16:8 h Licht:Dunkelphase, bei ca. $150 \mu\text{mol e}^- \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$). Geerntet wurden Pflanzen, die ca. 5-7 cm hoch und deren Blätter noch nicht vollständig entfaltet waren. Je Versuchstag wurden 2 Schalen geerntet.

2.4.2 Chloroplasten-Isolation

Es wurde darauf geachtet, möglichst viel Blattmaterial und wenig Sproß zu ernten. Das Blattmaterial wurde sofort in 1000 ml eiskaltes Isolationsmedium gegeben und mit einer Schere zerschnitten. Mit dem Ultraturrax wurden die Blätter auf wenige Quadratmillimeter zerkleinert (kleinste Stufe). Das Homogenat wurde durch 2 Lagen Baumwollmull und eine Lage Nylongaze (22µm) filtriert und anschließend zentrifugiert. (Beckmann JS Zentrifuge, Rotor JLA 10.500, 4500 U/min, 3800 x g, 1 min, 4 °C)

Das Pellet wurde sofort in 10-15 ml Isolationsmedium mit einem feinen Pinsel vollständig resuspendiert. Die Suspension wurde dann auf einen Percoll-Gradienten aufgetragen (10 ml 85 % Percoll unterschichtet mit 15 ml 40 % Percoll) und zentrifugiert (7,5 min, Beckmann JS Zentrifuge, Rotor JS 13.11 5100 U/min, 4079 x g, 4 °C. Der Chloroplasten-Bruch der oberen

Interphase (Puffer/45 % Percoll) wurde verworfen. Die untere Interphase mit den intakten Chloroplasten (45 %/85 % Percoll) wurde abgezogen, mit Insertionspuffer 1:4 verdünnt, vorsichtig geschwenkt und erneut zentrifugiert (Beckmann JS Zentrifuge, Rotor JS 13.11, 4000 U/min, 2200 x g, 4 °C, 1,5 min). Der Überstand wurde dekantiert, und das Zentrifugenröhrchen mit einem Haushaltstuch trockengewischt. Schließlich wurden die Chloroplasten in wenig Insertionspuffer (1-2 ml) aufgenommen.

Material:

EDTA pH 8, 0,2M
Hepes-KOH pH 8, 1M

Percoll-Lösung

	Endkonzentration	M [g/mol]	ad 100 ml
Sorbitol	0,33 M	182,2	6,01 g
Hepes-KOH pH 8/1M	50 mM	238,3	5 ml
EDTA pH 8 (0,2M)	1 mM	372,3	0,5 ml
Percoll	40 %		40 ml
	oder		
Percoll	85 %		85 ml

Die Lösung wurde mit sterilem Aqua dest. in einem sterilen Gefäß auf das Endvolumen aufgefüllt.

Isolationsmedium

	Endkonzentration	M [g/mol]	ad 2000 ml
Sorbitol	0,33 M	182,2	120,25 g
Hepes-KOH pH 8	50 mM	238,3	23,83 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O (1M)	1,5 mM	203,3	3 ml

Nach Einstellen des pH Wertes auf pH 8 wird die Lösung auf das Endvolumen aufgefüllt autoklaviert.

Insertionspuffer:

	Endkonzentration	M [g/mol]	ad 1000 ml
Sorbitol	0,33 M	182,2	60,12 g
Hepes-KOH pH 8	50 mM	238,3	11,92 g

Nach Einstellen des pH Wertes auf pH 8 wird die Lösung auf das Endvolumen aufgefüllt und anschließend autoklaviert.

2.4.3 Isolation von Stromaprotein und Thylakoiden

Das Volumen der Chloroplastensuspension aus Kapitel 2.4.2 wurde bestimmt und die Chloroplasten wurden mit Insertionspuffer (siehe Kapitel 2.4.2) auf 3 mg Chl/ml eingestellt. Nach einem Zentrifugationsschritt (Eppifuge, 2600 x g, 3 min, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und dessen Volumen bestimmt. Danach wurde das gleiche Volumen Lysispuffer (10 mM Hepes-KOH pH8) zugegeben. Die Chloroplasten wurden mit einer blauen Pipettenspitze sorgfältig gemischt und für 10 Minuten auf Eis lysiert. Schließlich wurden Thylakoide und Stroma durch Zentrifugation (Eppifuge, 8000 x g, 4 °C, 10 min) voneinander getrennt. Der Proteingehalt des Stromas wurde wie in Kapitel 2.4.4 beschrieben bestimmt. Das Thylakoidpellet wurde in Insertionspuffer aufgenommen und mit diesem Puffer auf 2 mg Chl/ml eingestellt. Anfänglich wurde hier Insertionspuffer mit 10 mM MgCl₂ verwendet, um die Membranintegrität ("Stacking") zu stabilisieren (Williams, *et al.*, 1987; Cline, 1988). Für Insertionsexperimente mit Histidin-markierten Proteinen erwies sich jedoch eine erhöhte Metallionen-Konzentration als ungünstig (siehe z.B. Kapitel 3.4, Ergebnisteil). Es war andererseits möglich ohne die Supplementation des Insertionspuffers mit MgCl₂, ausreichende Mengen an (p)LHCP in Thylakoide zu inserieren, so daß an dieser Stelle auf die Zugabe von MgCl₂ verzichtet wurde und Mg²⁺ nur noch für die Insertionsreaktion selbst, in Form von Mg-ATP, zugegeben wurde (siehe auch Kapitel 2.5.2). Bis zum eigentlichen Insertionsexperiment wurde die Thylakoid-Suspension dunkel und auf Eis gehalten. Die Stroma-Fraktion wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren. Sie konnte so auch über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden. Um die Insertionskompetenz nicht zu verringern, wurden eingefrorene Stroma-Aliquots nur einmal aufgetaut.

2.4.4 Bestimmung von Stromaprotein

Da die Proteine in der Stroma-Fraktion als Gemisch vorliegen, konnte die Menge nur annäherungsweise bestimmt werden. Eine Eichgerade, die mit dem Biorad Mikroassay (Biorad-Reagenz, Biorad, München) und Rinderserumalbumin als Eichprotein erstellt wurde diente als Referenz. Zur Berechnung der Proteinkonzentration in der Probe wurde folgende Formel ermittelt:

$$\text{Protein } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (\text{E595} - 0,0034) / 0,048$$

Die Probe wurde 1: 1000 verdünnt (3 x (1 µl Probe + 800 µl H₂O + 200 µl unverdünnte Biorad-Lösung)) und sofort gemischt. Nach 10 Minuten wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt.

2.4.5 Bestimmung des Chlorophyllgehalts von Chloroplasten und Thylakoiden

Der Chlorophyllgehalt wurde photometrisch in 80 % Aceton bestimmt. Es wurde mit den Umrechnungsfaktoren von Porra *et al.*, 1989 gerechnet:

$$[\mu\text{g/ml}] \text{ Chlorophyll a} = (12,25 \times E_{663,6}) - (2,55 \times E_{646,6})$$

$$[\mu\text{g/ml}] \text{ Chlorophyll b} = (20,31 \times E_{646,6}) - (4,91 \times E_{663,6})$$

2.5 Insertion von überexprimiertem (p)LHCP in isolierte Thylakoide

2.5.1 Proteinvorbereitung

Direkt vor der Insertion wurden pro 100 μl -Ansatz 5×10^5 cpm (ca. 0,1-0,5 μg) radioaktiv markiertes Protein (siehe Kapitel 2.3) zentrifugiert (15800 x g, 5 min). Der Überstand wurde mit einer ausgezogenen Spitze vorsichtig abgenommen und verworfen. Das getrocknete Pellet wurde in 2 μl 8 M Harnstoff/ 8 mM DTT gelöst und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Direkt vor der Insertionsreaktion wurde die Probe zentrifugiert (15800 x g 1 min), um nicht gelöstes Protein zu pelletieren.

2.5.2 Insertion

Für die Insertionsreaktion der Lichtsammelproteine in isolierte Thylakoide wurden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge in einem 2-ml Reaktionsgefäß zusammengegeben:

Insertionsmedium	19,4 μl	237 mM Sorbitol, 67 mM Hepes-KOH pH8, 5,1 mM DTT
H ₂ O	14,6 μl	
2 x Thylakoide	17 μl	34 μg Chl in 0,33M Sorbitol, 50mM Hepes-KOH, pH 8
3 x Stroma	5 μl	mindestens 10 μg Stromaprotein/ μl in 10 mM Hepes-KOH, pH 8
Mg-ATP	2 μl	0,5 M ATP, 0,5 -1,5M Mg ²⁺ , (je nach Herstellercharge)
Protein in Urea	2 μl	500.000 cpm (0,1-0,5 μg)

Die Endkonzentrationen der einzelnen Komponenten entsprach: 1,16 mM DTT, 10 mM ATP, 5-15 mM Mg²⁺, 102 mM Sorbitol, 26 mM Hepes-KOH pH 8, mind. 450 μg Stromaprotein und ca. 32 – 200 nM Lichtsammelprotein.

Die Reaktion fand unter Beleuchtung (ca. 50 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) in einem auf 25 °C temperierten Schüttelwasserbad statt. Nach 30 min wurde die Reaktion abgestoppt. Die Reaktionsgefäße wurden sofort auf Eis gestellt, mit 200 μl Puffer versetzt (1/3 Insertpuffer 2/3 10 mM Hepes-KOH pH 8) und anschließend zentrifugiert (8000 x g, 10000 rpm Eppifuge 4 °C, 5 min)

Material:

1 x Insertionsmedium:

für 1,94 ml

Sorbitol (1M)	460	µl
Hepes-KOH pH 8 (1M)	120	µl
MgCl ₂ x 6 H ₂ O (0,1 M)	260	µl
10-10 HM	1000	µl
DTT (0,1M)	100	µl

1 x Insertionsmedium ohne Mg²⁺:

für 1,94 ml

Sorbitol (1M)	460	µl
Hepes-KOH pH 8 (1M)	130	µl
H ₂ O	1250	µl
DTT (0,1M)	100	µl

2.5.2.1 Proteaseverdau nach Insertion

Das Thylakoidpellet eines 100-µl-Ansatzes wurde in 100 µl 10-0,5 HC aufgeschlemmt und mit 50 µl Thermolysin (1 mg/ml in 10-0,5 HC) versetzt. Anschließend wurden weitere 350 µl 10-0,5 HC zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 25 min bei 25 °C im Schüttelwasserbad. Die Thermolysin-Behandlung wurde abgestoppt, indem 10 mM EDTA und weitere 500 µl 10-5 HE zugegeben wurden.

Material:10-0,5 HC

	Endkonzentration	M [g/mol]	für 50 ml
Hepes-KOH pH 8 (1 M)	10 mM		0,5 ml
CaCl ₂ x 2 H ₂ O (1 M)	0,5 mM	174,02	25 µl

10-5 HE

	Endkonzentration	M [g/mol]	für 50 ml
Hepes-KOH pH 8 (1 M)	10 mM		0,5 ml
EDTA (0,5 M)	5 mM	372,3	0,5 ml

2.5.3 Gelelektrophoresen

In der Regel wurden die Insertionsansätze nach der Insertionsreaktion so geteilt, daß sowohl ein unverdautes, als auch ein Protease-behandeltes Aliquot für die Gelelektrophoresen zur Verfügung stand. Neben der standardmäßig durchgeführten denaturierenden Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.5.3.1) wurde ein Aliquot der Probe (8,5-17 µg Chlorophyll entsprechend 1/4-1/2 Insertionsansatz) auf einem schwach denaturierenden Gel (siehe Kapitel 2.5.3.2) aufgetrennt. Hierzu wurden die Membran-Pellets in Solubilisierungspuffer solubilisiert.

2.5.3.1 Denaturierendes Laemmli-Gel

Die Membran-Proteine wurden zunächst gefällt, um störende Pigmente und Membran-Lipide von der Probe abzutrennen. Dies sollte ein möglichst gleichmäßiges und reproduzierbares Laufverhalten der Proben zu begünstigen. Die unbehandelten Membranen aus Kapitel 2.5.2 bzw. Protease-behandelte Membranen aus Kapitel 1.1.1.1 wurden zentrifugiert (Eppifuge, 8000 rpm, 4°C, 5 min). Pro 34 µg Chlorophyll wurde mit 80 µl 10-5 HE-Puffer und 320 µl 100% Aceton (Endkonzentration 80 % Aceton) für mindestens 1 h bei -20 °C gefällt. Die Probe wurde zentrifugiert (15 min, max. g, Eppifuge 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet mit 95% Aceton gewaschen. Das Protein-Pellet wurde nach dem Trocknen in Sparmix aufgenommen (30 µl 1 x Sparmix pro 100 µl Insertionsansatz) und vor dem Gelauftrag 1 min gekocht. Es wurden 10 - 15 µl (1/3 – 1/2 Insertionsansatz, entsprechend 11,3 –17 µg Chlorophyll) auf ein denaturierendes Gel aufgetragen (siehe auch 2.2.3.).

Die Proben liefen bei einer Spannung von etwa 100-150 V für ca. 1 ½h. Danach wurden die Gele mit Coomassie angefärbt (siehe Kapitel 2.2.4), getrocknet und autoradiographisch bzw. fluorometrisch ausgewertet (siehe 2.3.1.2. und 2.3.1.3).

2.5.3.2 Schwach denaturierendes Laemmli-Gel

Für die Auftrennung von Chlorophyll-Proteinkomplexen in schwach denaturierenden Gelen (siehe auch 2.2.3), wurden die Membran-Pellets nach der Insertion 1:1 in 2 x Solubilisierungspuffer (Verändert nach Allen und Staehelin, 1994) 10-5 HE resuspendiert und bei 60 – 100 V auf einem schwach denaturierendem Gel aufgetrennt. Nach dem Trocknen wurden die Gele autoradiographisch bzw. fluorometrisch ausgewertet.

Erfolgte die Gelelektrophorese nicht am gleichen Tag, wurden die Membran-Pellets mit 10 µl 10-5 HE überschichtet ohne sie zu resuspendieren und bei -20 °C aufbewahrt. Die Proben wurden dann auf Eis aufgetaut, kurz zentrifugiert und der Puffer-Überstand wurde vor der Solubilisierung abgenommen.

Material:

2 x Solubilisierungspuffer (nach Allen und Staehelin, 1991; leicht verändert)

	Endkonzentration	10 ml
Tris-HCl pH7	2 mM	20 µl
Glyzerin 80%	10 %	1,25 ml
OG 10%	0,45 %	450 µl
DM 10%	0,45 %	450 µl
LDS 10%	0,1 %	100 µl

2.6 Bindung rekombinanter (His)₆-Lichtsammlerproteine an Magnetpartikel

Verschiedene paramagnetische Partikel mit unterschiedlichen chelatisierenden Gruppen sollten auf die Fähigkeit getestet werden, Hexahistidyl-markierte (p)LHCP-Derivate über einen Metallkomplex spezifisch, jedoch reversibel zu binden. Im Prinzip handelt es sich hier, wie bei der Bindung Hexahistidyl-haltiger Proteine an Nickel-Nitrilotriacetsäure (Kapitel 2.2.6.2.1), um eine Affinitäts-Methode ("Immobilized Metal Affinity Adsorption", IMA). Die chelatisierende Gruppe ist in diesem Falle zusätzlich an magnetische Partikel gebunden. Das Protein wird im Batch-Verfahren an die Partikel gebunden. Wird das Reaktionsgefäß in einen Magnetständer gestellt, werden die Partikel mitsamt dem gebundenen Protein an die Wand des Gefäßes gezogen. Das Protein läßt sich konzentrieren, indem der verbleibende Überstand abgenommen wird. Durch Waschen der Partikel werden Verunreinigungen abgetrennt. Die Elution der Proteine kann auf zweierlei Arten erfolgen: Durch eine pH-Erniedrigung wird die Bindungsaffinität aufgehoben; Histidin fungiert in diesem Falle nicht mehr als Elektronendonator. Oder aber man benutzt Eluenten, die ähnliche Eigenschaften wie der Ligand besitzen. Diese verdrängen, im Überschuß eingesetzt, als Gegen-Liganden die Metallionen kompetitiv (Imidazol / Histidin).

Partikel	Nanomag-D	LOP
Ø [µm]	0,25	1,0
Matrix	Dextranpartikel	Latexpartikel
Oberfläche	DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure); –COOH; HEDTA; NTA	Co ²⁺ -NTA
Besonderheiten	Nicht komplexiert	Mit Kobalt beladen
Hersteller	microcaps GmbH, Rostock- Warnemünde	Xenopore, USA / Dunn Labortechnik, Asbach
Bindekapazität	Standardreihe AAS-Messung: Für DTPA und Nickel ca. 68 nmol Ni ²⁺ /mg	Herstellerangaben 3 nmol Co ²⁺ /mg (16,6 pmol/cm ²) 0,9 nmol/mg 22-mer H ₆ -markiertes Oligopeptid
Konzentration	25 mg/ml Metall-gesättigt: 10 mg/ml	10 mg/ml

Tabelle 2.5.3-1 Paramagnetische Partikel

2.6.1 Elementanalyse mit dem Atom-Absorptions-Spektrometer (AAS)

Die Nickel-Bindekapazität für nanomag DTPA-Partikel wurde mit einem Atom-Absorptions-Spektrometer (AAS, FMD3, Zeiss) bestimmt. Dem Prinzip liegt zugrunde, daß ein durch ein angeregtes Atom emittiertes Lichtquant von einem nicht angeregten Atom des gleichen Elements absorbiert werden kann. Die durch die Absorption um den Betrag X verringerte Intensität des Primärlichtes wird vom Detektor registriert. Sie folgt dem Gesetz von Lambert Beer. Die Anregungsquelle ist hier eine Hohlkathodenlampe, in die das zu untersuchende Element eingegossen ist (hier: Nickel /Neongas). Durch Anlegen einer hohen Spannung wird das Gas in der Lampe ionisiert und schlägt Atome aus der Kathode heraus. Das Element wird in einen angeregten atomaren Zustand überführt. Fallen die Atome in den Grundzustand zurück, emittieren sie ein für das Element charakteristisches Atomemissionsspektrum (Linienspektrum) mit definierten Energiebeträgen. In einem Atomizer werden die in einer Flamme (hier: Luft-Acetylen) zerstäubten, gasförmigen Proben-Atome (im Grundzustand!) mit dem Licht des Atomemissionsspektrums durchstrahlt. Sind dort Atome der zu untersuchenden Substanz vorhanden, absorbieren sie dieses eingestrahlte Licht (Linienabsorption). Die spektroskopische Untersuchung der Absorptionslinie wird durch eine nachgeschaltete optische Einheit, dem Monochromator, eingeleitet. Nachdem das Licht zerlegt wurde (meist durch ein Gitter), wird die Resonanzlinie selektiert, bei der die Extinktion des Lampenspektrums am störungsfreiesten feststellbar ist (justierbarer Spalt). Die Intensität der Resonanzlinie wird gemessen und als Schreiberwert angegeben.

Die Nachweisgrenze für Nickel liegt laut Herstellerangaben bei $9 \mu\text{g/l Ni}$ (in wässriger Lösung). Die Messung erfolgte nach Angaben des Herstellers bei der Resonanzwellenlänge von 232 nm und einer Spaltbreite von $0,2 \text{ nm}$.

Es wurde eine Eichreihe für eine NiCl_2 -Lösung erstellt. Dazu wurde eine NiCl_2 -Stammlösung (1g/l Ni^{2+}) in mehreren Schritten (bis $0,05 \text{ mg/l Ni}^{2+}$) verdünnt und die Extinktion der einzelnen Verdünnungsstufen mit dem AAS bestimmt. Aus der durch vortexen homogenisierten Nanomag-D-DTPA-Partikelsuspension wurden 2 mg ($80 \mu\text{l}$ Partikel) entnommen. Der Überstand der Suspension konnte abgenommen werden, nachdem das Reaktionsgefäß in den Magnetständer eingesetzt und die Partikel an der Gefäßwand angelagert waren. Die Partikel wurden dann $1 \times$ in $100 \mu\text{l}$ 10 mM Tris-HCl , $\text{pH } 8$ gewaschen und mit Nickelionen gesättigt ($99 \mu\text{l}$ 1 M NiCl_2 + $1 \mu\text{l}$ $1 \text{ M Tris-HCl pH } 8$). Nach einer 20 min Inkubation der Partikel, wurden diese zunächst mit $10 \text{ mM Tris-HCl pH } 8$ gewaschen. Hier wurden drei unterschiedlich stringente Waschungen vorgenommen:

2 x mit $200 \mu\text{l}$	1 x $500 \mu\text{l}$	$10 \text{ mM Tris-HCl pH } 8$	= P1
2 x mit $200 \mu\text{l}$		$10 \text{ mM Tris-HCl pH } 8$	= P2
2 x mit $100 \mu\text{l}$		$10 \text{ mM Tris-HCl pH } 8$	= P3

Anschließend wurden die Nickelionen mit $0,5 \text{ M EDTA}$ ($2 \times 100 \mu\text{l}$) eluiert. Das Eluat wurde $1:10$, $1:40$ und $1:160$ verdünnt, im AAS vermessen und mit der Eichgerade verglichen.

Weiterhin wurde eine reine 0,5 M EDTA-Lösung vermessen, um auszuschließen, daß EDTA die Messung der Probe stört. Als Auswertekriterium diente die Extinktion (mittlerer Schreiberauslag) über die Meßdauer.

2.6.2 Bindung und Elution Hexahistidyl-markierter Lhcb1-Derivate

Mit Metallionen (Co^{2+} bzw. Ni^{2+}) gesättigte Magnetpartikel (300 μg Partikel, siehe Kapitel 2.6, sowie Tabelle 2.5.3-1) wurden zunächst mit 3 x 500 μl Waschpuffer1 gewaschen. Dann wurden die Partikel bis zum Versuchsanfang im gleichen Puffer aufgenommen (10 mg/ml Metall-gesättigte Partikel). Das zu bindende Protein wurde in Harnstoff-haltigem Bindepuffer gelöst (ca. 100-150 ng/ μl). Der Puffer-Überstand der Partikel wurde abgehoben und durch die Proteinlösung ersetzt. Die Inkubation der Partikel mit der Proteinlösung erfolgte für 10–30 min bei RT, bzw. 37 °C. Die Partikel wurden anschließend in Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurden die Partikel für ca. 15-20 min bei RT, bzw. 37 °C in Elutions-Puffer inkubiert, mit dem das an die Partikel gebundene Protein eluiert werden sollte. Die (Binde-, Wasch-, und Elutions-) Überstände wurden in vergleichbaren Aliquots auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Das Gel wurde mit Coomassie-Färbelösung angefärbt (2.2.4) und getrocknet. Die einzelnen Fraktionen wurden auf auftretende Proteinbanden untersucht. Als Referenz diente ein Aliquot von in Bindepuffer gelöstem Protein, das nicht an Partikel gebunden, sondern direkt auf das Gel aufgetragen wurde.

Bei Versuchen zur Bindspezifität der Magnetpartikel, die mit Stroma- bzw. Thylakoid-Proteinen durchgeführt wurden, wurden 4 μg Hexahistidyl-Lhcb1 mit 150 μg Partikeln inkubiert. Das Protein im Überstand wurde mit der eingesetzten Proteinmenge verglichen. Von beiden Proben wurde jeweils ein Aliquot auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Um eine bessere Auftrennung der Stroma- bzw. Thylakoidproteine zu erzielen wurden zum Teil größere Polyacrylamid-Gele gegossen (ProteanIIXi, Biorad).

Material:Waschpuffer 1

Tris-HCl, pH 7,5	10	mM
------------------	----	----

Bindepuffer

Tris-HCl, pH 8	10	mM
Urea	8	M

Waschpuffer

Tris-HCl, pH 7,5	10	mM
Urea	8	M

Elutionspuffer 1

Tris-HCl, pH 7,5	10	mM
Urea	8	M
Imidazol	300	mM
SDS	0,3	%

Elutionspuffer 2

Tris-HCl, pH 7,5	10	mM
NaCl	0,3	M
NaH ₂ PO ₄	0,1	M
Imidazol	300	mM
SDS	1	%

Anfänglich wurden alle Puffer mit 5mM DTT supplementiert. Da aber die Gefahr bestand, die Metallionen zu reduzieren, wurde bei den Versuchen (siehe Ergebnisteil) darauf verzichtet. Auch wurde dem Elutions-Puffer in späteren Versuchen SDS zugegeben und der pH-Wert von 6,3 auf 7,5 erhöht. Bei Versuchen mit Thylakoiden oder Stroma wurde Hepes-Puffer verwendet. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden wurde für die in Kapitel 3.3.3 und 3.3.4 auch der Waschpuffer mit 100 mM NaCl und 50 mM NaH₂PO₄ versetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Konstruktion Hexahistidyl-markierter Lhcb1-Derivate

Das Lichtsammelprotein Lhcb1 ist ein kerncodiertes Protein, das posttranslational in den Chloroplasten importiert und via SRP-Weg in die Thylakoidmembran eingebaut wird. Der Einbaumechanismus für das Protein ist nicht bekannt. Um die Topographie der Membraninsertion zu untersuchen, wurden Lhcb1-Derivate hergestellt, die in bestimmten Protein-domänen einen Hexahistidyl-Rest ("His-Tag") tragen. Der "His-Tag" sollte dazu dienen, den Einbau des rekombinanten Proteins in isolierte Erbsenthylakoide unter bestimmten Bedingungen zu hemmen (Insertionsreaktion siehe Kapitel 2.5). Mit den in Kapitel 2.1 beschriebenen Klonierungsschritten wurden alle gewünschten Lhcb1-Derivate hergestellt. Die in der Arbeit verwendeten Lhcb1-Derivate sind in Abbildung 3.1-1 dargestellt.

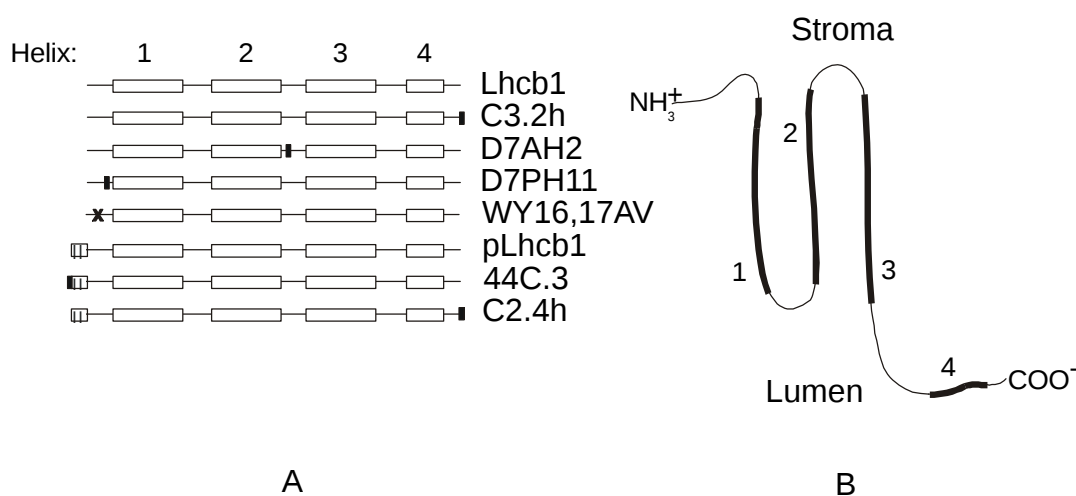


Abbildung 3.1-1 Skizzen der Lhcb1-Konstrukte A: Übersicht über die Lhcb1-Derivate, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die schwarzen Balken zeigen die Position des "His-Tags" im jeweiligen Lhcb1-Derivat. Gestreifte Balken repräsentieren das Signalpeptid des Lhcb1-Precursor-Proteins. X markiert die Position der Punktmutation der Trimerisierungs-Mutante WY16,17AV. B: Relative Orientierung der Protein-Domänen in der Thylakoidmembran. Fett gedruckte Linien markieren die α -Helices von Lhcb1

Die Klonierungsschritte, die der Erstellung der Lhcb1-Konstrukte dienten, wurden mit Hilfe unterschiedlicher Nachweismethoden kontrolliert. Neue Restriktionsschnittstellen wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen nachgewiesen. Ob die Position der Restriktionsstelle im gewünschten DNA-Abschnitt lag, wurde mittels Mehrfach-Restriktionsverdau überprüft. Die Verdau lieferten DNA-Fragmente, deren Länge die Positionen der Restriktionsschnittstellen erkennen ließ. Der Nachweis der "His-Tags" erfolgte meist erst auf Proteinebene, mit für diese Peptidsequenz spezifischen Antikörpern. Schließlich wurde die korrekte DNA-Sequenz eines ausgewählten, laut Voruntersuchungen positiven Klons durch Sequenzierung bestätigt.

Die folgenden Abbildungen (3.1-2 bis 3.1-4) dokumentieren die Nachweisschritte, die bei der Herstellung der Lhcb1-Mutante C2.4h durchgeführt wurden. Die Konstruktion dieses Klons soll hier als Beispiel für die Herstellung aller anderen Klone stehen.

Die Fragmente in Abbildung 3.1-2 wiesen die Länge auf, die durch die Amplifikation des, zwischen den beiden eingesetzten Primern gelegenen, DNA-Stückes zu erwarten war: Spur 2 = 466 bp, Spur 3 = 262 bp und Spur 4, ebenfalls 466 bp. Das Produkt der zweiten PCR-Runde hatte die gleiche Länge wie das Produkt der Kontroll-PCR (Spur 1), die mit den beiden Randprimern durchgeführt worden war. Da das Fragment aus der zweiten PCR-Runde die richtige Größe zu haben schien, wurden Vektor-DNA (Klon 1n.1 aus SCS 110-Zellen) und das PCR-Fragment mit den beiden Restriktionsenzymen *Pst*I und *Bcl*I verdaut, ligiert und anschließend in *E.coli* transformiert (ohne Abbildung).

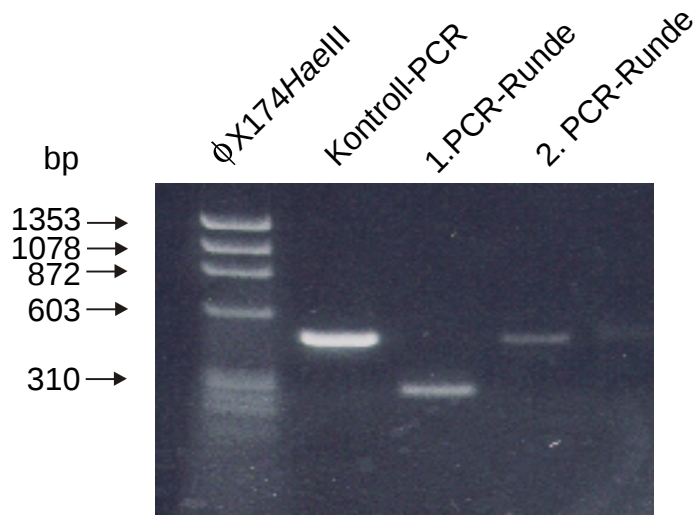


Abbildung 3.1-2 Überprüfung der PCR-Produkte aus der ortsgerichteten Mutagenese.

(siehe dazu auch Kapitel 2.1.4) In einem 100 µl PCR-Ansatz wurden 10 ng pLhcb1-DNA, je 50 pmol Primer-DNA, 200 µM dNTPs und 2,5 U pfu-Polymerase in 1 x pfu-Puffer in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Die PCR-Reaktion lief über 25 Zyklen mit 30 sec bei 95 °C (Denaturieren), 30 sec bei 45 °C (Primer-Annealing) und 45 sec bei 72 °C (Polymerisieren). Das isolierte DNA-Fragment aus der ersten PCR-Runde wurde als Primer in Form von doppelsträngiger DNA in der zweiten PCR Runde eingesetzt (10% aus der ersten Runde, die DNA wurde zunächst denaturiert). Die zweite PCR-Runde lief über 30 Zyklen mit 1 Min, 30 sec 95 °C (Denaturieren), 55 sec 55 °C (Primer-Annealing) und 45 sec 72 °C (Polymerisieren). Aus den 100 µl PCR-Reaktionen wurden je 5 µl auf ein 1,7 % Agarose-Gel aufgetragen. Die Fragmentlänge wurde mit Hilfe eines aufgetragenen DNA-Markers (φX174-DNA, *Hae*III-verdaut) bestimmt. Spur1 = φX174-Marker-DNA, Spur 2 = PCR-Produkt einer Kontroll-PCR-Runde mit den Randprimern (780⁺ und S1). Spur 3 = PCR-Produkt der ersten PCR-Runde mit den Primern 984⁺ und S1. Spur 4 = PCR-Produkt der zweiten PCR-Runde mit 780⁺ und dem ersten PCR-Produkt als Primer. bp = Basenpaare; Das Gel wurde mit dem Biorad Transilluminator Gel Doc 1000 und der zugehörigen Software dokumentiert.

Einzelne koloniebildende Klone wurden ausgewählt, auf Agar-Platten vereinzelt und in einer Flüssigkultur vermehrt. Aus den Zellen wurde Plasmid-DNA nach He isoliert (siehe Kapitel 2.1.2.1). Die Einführung der neuen Restriktionsschnittstelle wurde überprüft, indem die DNA mit dem Restriktionsenzym *Xma*I verdaut und auf ein 1%-iges Agarose-Gel aufgetragen wurde (Abbildung 3.1-3). Zur Kontrolle wurde ein weiteres DNA-Aliquot des gleichen Klons mit *Bam*HI verdaut. Beide Verdaue sollten linearisierte Plasmid DNA liefern. Im Gel läuft linearisierte DNA als ein Fragment, dessen Länge der des Plasmids entsprechen muß. Die Abbildung zeigt, daß es sich bei den verdauten Proben in den Spuren 3;4 und 5;6 je um einen positiven Klon mit einer erwarteten Plasmid-Länge von 4367 bp handelte. Die DNA des ersten Zwischenklons C1.1Xma wurde mit *Xma*I verdaut und anschließend mit dem Oligonukleotidpaar ligiert, welches für die sechs zusätzlichen Histidin-Reste codiert. Auch hier

wurden nach der Transformation einige Klone gepickt und einzeln vermehrt. Der Einbau des Hexahistidyl-Restes wurde dann auf Proteinebene überprüft (Abbildung 3.1-4).

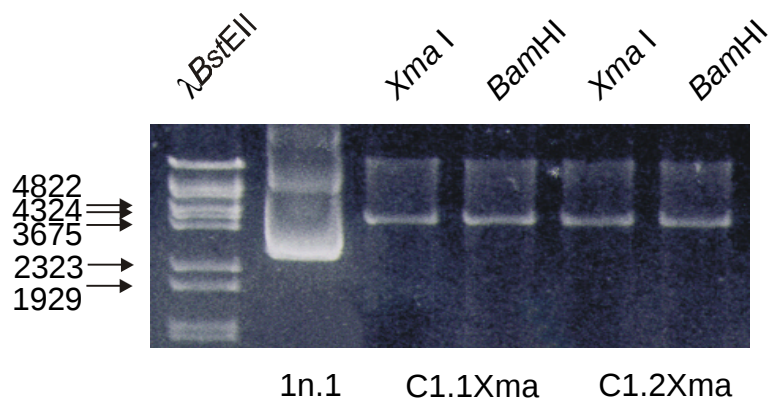


Abbildung 3.1-3 Überprüfung einer eingeführten Restriktionsschnittstelle. (siehe dazu auch Kapitel 2.1.7) Aus je 1,5 ml Flüssigkultur wurde Plasmid DNA nach He isoliert. Die DNA wurde in 30 µl TE-Puffer aufgenommen. Je 5 µl DNA wurden mit den Enzymen *Bam*HI (Spuren 4 + 6), bzw. *Xma*I (Spuren 3 + 5) verdaut und auf einem 1%-igen Agarose-Gel aufgetrennt. Als Größenmarker diente *Bst*EII-verdaute λ-DNA (Spur 1). Spur 2 = unverdaute Plasmid-DNA (Klon 1n.1), Spur 3+4 = Klon C1.1Xma; Spur 5+6 = Klon C1.2 Xma; Das Gel wurde mit dem Biorad Transilluminator ,Gel Doc 1000 und der zugehörigen Software dokumentiert.

Zum Nachweis des "His-Tags" wurden Protein-Einschlußkörper der einzelnen Klone isoliert (siehe Kapitel 2.2.1). Diese wurden in einem denaturierenden 12%-igem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Ein Gel wurde Coomassie gefärbt, ein identisches, zweites wurde geblottet. Klone mit "His-Tag" zeigten nach der colorimetrischen Detektion mit BCIP/NBT einen violetten Niederschlag auf der Nitrocellulosemembran. Abbildung 3.1-4 zeigt, daß einige Klone schon im Coomassie gefärbten Gel nicht die richtige Proteinelänge zu haben schienen (Spuren 4, 6 und 7). Auf dem spezifisch gefärbten Western-Blot stellte sich dann heraus, das von zehn untersuchten Klonen vier ein positives Signal lieferten. Die korrekte DNA-Sequenz des Klons C2.4h (Spur 5) wurde durch Sequenzierung bestätigt.

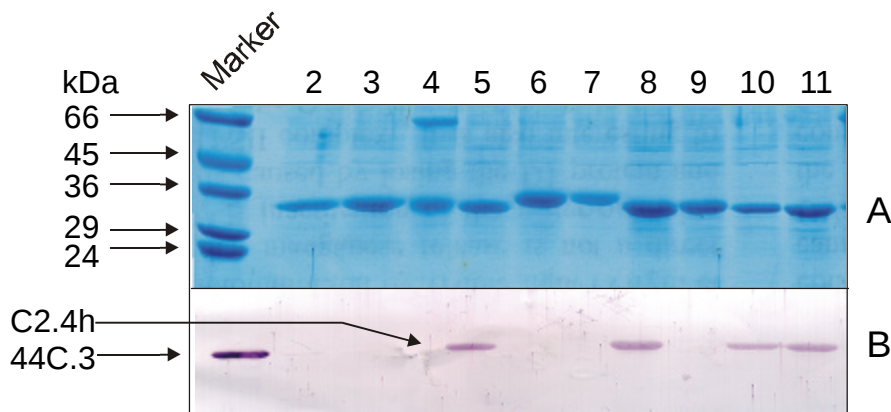


Abbildung 3.1-4 Überprüfung Histidin-markierter Klone auf Proteinebene. (siehe dazu auch Kapitel 2.2) Aus je 1,5 ml Flüssigkultur wurden Protein-Einschlußkörper isoliert und in 50 μ l Tris-Puffer resuspendiert. Je 1 μ l Suspension (ca. 1 μ g) wurde auf einem 12%-igen denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Ein Gel wurde mit Coomassie Blau angefärbt (A), ein zweites Gel wurde geblottet (B). Die Detektion Hexahistidyl-markierter Lhcb1-Derivate erfolgte nach immunologischer Antikörperreaktion colorimetrisch mit BCIP/NBT. Klon 44C.3 diente als Marker für den Western-Blot.

3.2 Rekonstitution Hexahistidyl-markierter Lhcb1-Derivate

Die *in vitro* Rekonstitution von LHCII in Detergens-Mizellen ist eine schnelle Methode, um die Fähigkeit von Lhcb1-Derivaten zu testen, Pigmente zu binden und somit gefaltete, Pigment-Protein Komplexe auszubilden. Solche rekonstituierten Komplexe sind dem nativen LHCII sehr ähnlich. Da mit den Histidin-markierten Lhcb1-Derivaten Untersuchungen zum Thylakoid-Einbau gemacht werden sollten, war zunächst wichtig zu erfahren, ob schon die Veränderung im Protein alleine zu einem Verlust der Faltungskompetenz führen würde, denn die Bildung von Pigment-Protein Komplexen ist eine Voraussetzung für einen stabilen Einbau des Proteins (Kuttkat *et al.*, 1997).

Alle untersuchten Proteine falteten sich unter *in vitro*-Bedingungen zu Pigment-Protein Komplexen (LHCII). Auf dem ungefärbten, schwach denaturierenden Polyacrylamid-Gel (Abbildung 3.2-1, A) sind diese Pigment-Protein Komplexe als grüne Banden erkennbar. Freie Pigmente wanderten mit der Lauffront, sie zeigten also ein anderes Laufverhalten, als die im Komplex eingebauten. Bei den pLHCP-Derivaten hatte sich während des Gellaufs nicht rekonstituiertes Protein von rekonstituiertem Protein getrennt (Abbildung 3.2-1 B, Spuren 2-4). Rekonstituiertes LHCII wanderte schneller als die entsprechenden, nicht mit Pigmenten komplexierten Apoproteine. Die Komplexbande konnte daran identifiziert werden, daß die pigmentierten Proteine trotz Coomassie-Färbung immer noch deutlich grün gefärbt blieben. Komplexe und freie Proteine LHCP-Klone geringeren Molekulargewichts konnten mit diesem Gelsystem nicht voneinander getrennt werden.

Die höchste LHCII-Ausbeute lieferte der mature Wildtyp-Klon D7f.3 (Lhcb1). Dieser Klon bildete eine deutliche LHCII-Bande, obwohl vergleichbar weniger Protein in der Rekonstitution eingesetzt wurde (siehe Coomassie gefärbtes Gel, B in Abbildung 3.2-2). D7AH2, mit einer Hexahistidyl-Verlängerung in der stromalen Schleife, war das einzige

Lhcb1-Derivat, das als Pigment-Protein Komplex während des Gellaufs deutlich Pigmente verlor. Diese verteilten sich als Schmier über die gesamte Gelspur. Die Veränderung der stromalen Schleife durch die zusätzliche Hexahistidyl-Verlängerung scheint also eine destabilisierende Wirkung auf die Pigment-bindenden Eigenschaften von Lhcb1 zu haben.

Im gefärbten Gel wurde eine weitere Proteinbande in der Nähe der Lauffront sichtbar. Hierbei handelt es sich um Lysozym, das bei der Isolation der Lhcb1-Einschlußkörper eingesetzt wurde, um die überexprimierenden Bakterien zu lysieren. Lysozym konnte im Verlauf der weiteren Protein-Aufreinigung nicht wieder vollständig entfernt werden.

Da der Protein-Marker unter denaturierenden Bedingungen (Zugabe von Sparmix) aufgetragen worden war, wanderten die Markerproteine nicht exakt mit den freien Apoproteinen der entsprechenden Rekonstitutions-Ansätze.

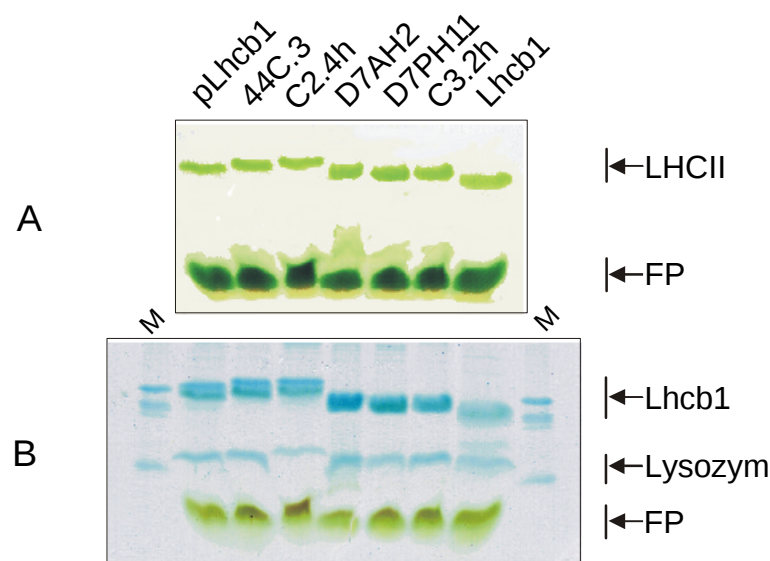


Abbildung 3.2-1 Histidin-markierte Proteine falten sich *in vitro* zu Pigment-Protein

Komplexen. Es wurden je ca. 10 µg Histidin-markiertes Protein (Klone siehe Kapitel 2.1, und 3.1), sowie pLhcb1 (Klon 42g.1) und Lhcb1 (Klon D7f.3) als Kontroll-Proteine in einem 25 µl Standard-Ansatz rekonstituiert (siehe Kapitel 2.2.7). Aus den Ansätzen wurden je 10 µl (ca. 3 µg Protein) in einem schwach denaturierenden, 12 %-igen Gel aufgetrennt (A und B). Gel B entspricht Gel A, die Proteine sind hier nur mit Coomassie Blau gefärbt. Als Längenmarker (M) wurde ein Proteingemisch aus je ca. 1 µg pLHCP (pLhcb1, Klon 42g.1) und LHCP (Lhcb1, Klon D7f.3) aufgetragen. LHCII = Lichtsammelkomplex II (Pigment-Protein Komplex); Lhcb1 = Lichtsammelprotein; FP = freies Pigment.

Wie bereits in Kapitel 3.1, Abbildung 3.2-1 gezeigt, hatte eine Hexahistidyl-Verlängerung im Lhcb1 kaum Auswirkungen auf die Faltungskompetenz der Proteine. Ob die Fähigkeit der Proteine, zur *in vitro*-Faltung eingeschränkt werden würde, wenn sie mit Metallionen komplexiert werden, sollte in folgendem Versuch getestet werden (Abbildung 3.3-2).

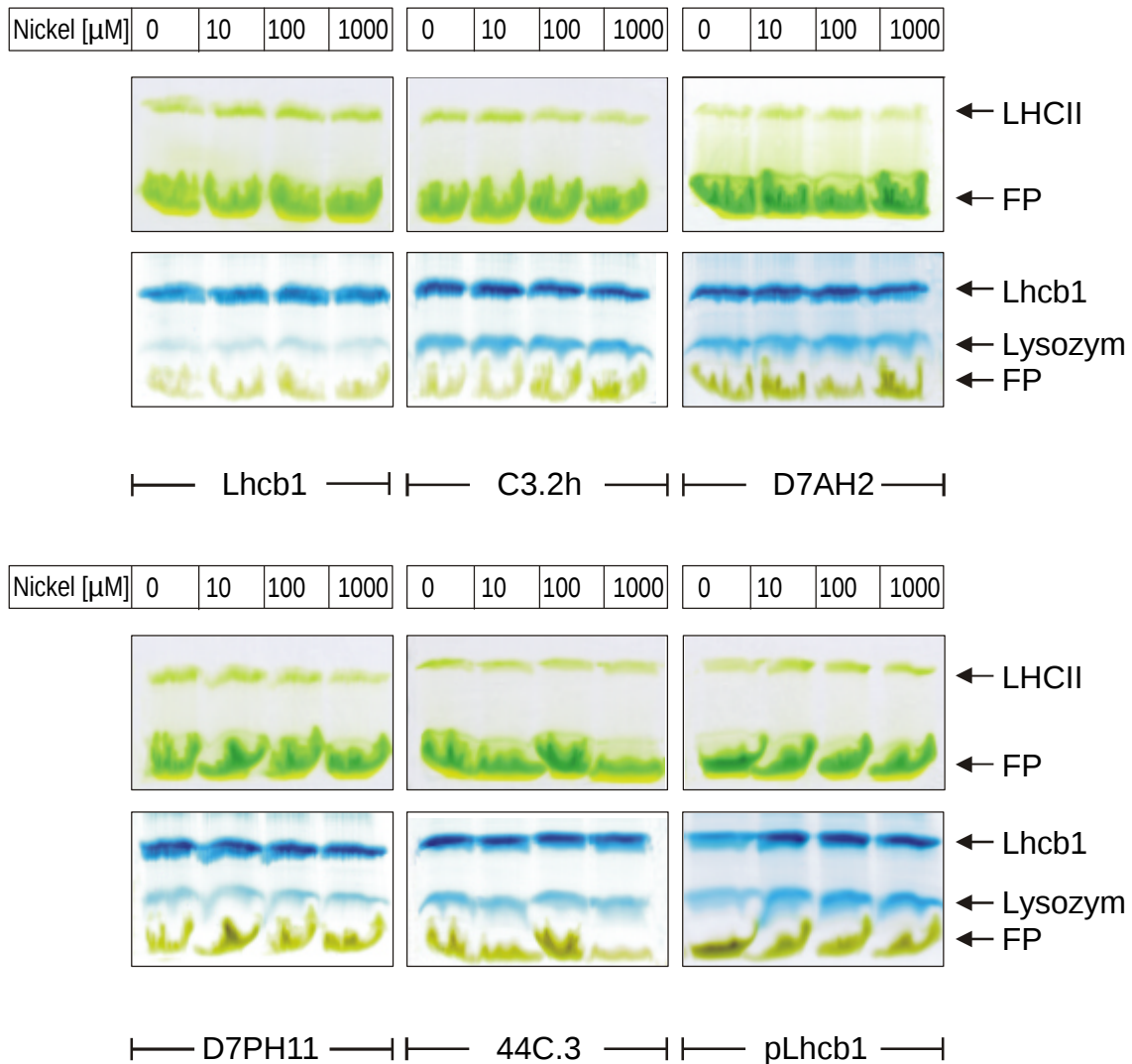


Abbildung 3.2-2 Histidin-markierte Proteine rekonstituieren in Anwesenheit von Ni^{2+} zu LHCII. Es wurden je 10 μ g Histidin-markiertes Protein, sowie pLhcb1 (Klon 42g.1) und Lhcb1 (Klon D7f.3) als Kontroll-Proteine in einem 25 μ l Ansatz rekonstituiert. Die Konzentrationen der eingesetzten Komponenten waren: 0,4 μ g/ μ l Apoprotein; Pigment-Totalextrakt aus Erbse mit 0,8 μ g/ μ l Chlorophyll (Chla/Chlb = 3,13:1) und 0,072 μ g/ μ l Xanthophyll (siehe auch Kapitel 2.2.7). Im Gegensatz zum Standardansatz wurde hier kein Dithiothreitol (DTT) zur Proteinlösung gegeben, um eine Reduktion der Nickelionen zu unterbinden. Aus den Ansätzen wurden je 20 μ l (ca. 6 μ g Protein) auf ein schwach denaturierendes 12 %-iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Gele wurden gescannt (obere grüne Gele) und anschließend weiter mit Coomassie gefärbt (untere blaue Gele). LHCII = Lichtsammelkomplex II (Pigment-Protein Komplex); Lhcb1 = Lichtsammelprotein; FP = freies Pigment. Das molare Verhältnis Ni^{2+} : Protein in einem 1000 μ M Nickelansatz lag bei $2,7 \times 10^6$:1.

Alle untersuchten Klone konnten unter den jeweiligen Versuchsbedingungen Pigment-Protein Komplexe ausbilden. Die insgesamt schlechteste Ausbeute an rekonstituierten Komplexen lieferte der Klon D7AH2. Schon die Rekonstitution ohne Ni^{2+} hatte zu einem Pigmentverlust während der Gelelektrophorese geführt (siehe auch Abbildung 3.2-1). Daher mußte davon ausgegangen werden, daß die Position des "His-Tags" selbst die Ursache für die geringere Stabilität der Komplexe war und nicht die Komplexierung des Proteins mit Ni^{2+} . Geringe Schwankungen in der Komplexausbeute waren darauf zurückzuführen, daß zum Teil zu wenig oder zu viel Protein auf das Gel aufgetragen worden war. Dies ist an den korrespondierenden Coomassie gefärbten Gelen zu erkennen: Zeigte sich im grünen Gel weniger oder mehr Ausbeute an Komplexen, so wies auch das gefärbte Gel in dieser Spur, entsprechend weniger oder mehr Protein auf, als in den anderen Spuren des gleichen Klons (weniger Protein z.B. bei

den Klonen: pLhcb1 und Lhcb1, jeweils Probe 0; mehr Protein bei den Klon: 44C.3 Probe 0). Bezieht man diese leichten Schwankungen in die Betrachtung mit ein, so konnten keine gravierenden Unterschiede in der Ausbeute der Komplexe mit unterschiedlichen Nickelkonzentrationen beobachtet werden. Eine geringe Abnahme in der Rekonstitutions-Ausbeute war nur bei den Histidin-markierten Klonen unter Zugabe von jeweils 1000 μM Ni^{2+} zu beobachten (Klone: C3.2h, D7AH2, D7PH11 und 44C.3 je bei 1000 μM Ni^{2+}). Bei den nicht markierten Proteinen Lhcb1 und pLhcb1 wurde diese Abnahme nicht festgestellt.

3.3 Bindung Hexahistidyl-markierter Lhcb1-Derivate an Magnetpartikel

Der "His-Tag" ist eine Markierung im Lhcb1-Protein, die zum einen dazu dient, das Protein zu detektieren. Der Nachweis des "His-Tags" kann immunologisch über eine Antikörperreaktion oder biochemisch über die Bindung an Metallchelate erfolgen (siehe Kapitel 2.2.6, Material und Methoden). Zum andern kann der "His-Tag" aufgrund seiner Affinität zu zweiwertigen Metallen als Affinitätsmarkierung benutzt werden, um das Protein aus einer Proteinmischung isolieren kann. Dazu dienen festen Trägersubstanzen (Agarose, Dextran, Latex), an die Metallchelate als His_6 -affine, immobile Gruppen gebunden sind (z.B. Nickel-Nitrilotriacetacid, Ni-NTA). Das "His-Tag"-Protein bindet unter "Binde-Bedingungen" (u.a. abhängig von pH-Wert, siehe Material und Methoden, Kapitel 2.2.6) im Gegensatz zum übrigen Protein-Gemisch an das Metallchelat. Mit darauf folgenden Wasch- und Elutionsschritten sollte das Protein unter "Elutionsbedingungen" wieder vom Träger ablösbar sein und in reiner Form vorliegen. Werden die Trägersubstanzen zusätzlich an paramagnetische Partikel gekoppelt, ist es möglich, daran gebundenes Protein mit Hilfe eines Magneten an die Wand des Reaktionsgefäßes zu ziehen. Überschüssige Lösung mitsamt störenden Substanzen wird entfernt. Vorteilhaft gegenüber einer Säule ist, daß die Lösung schnell abgenommen werden kann und das Protein sehr konzentriert bleibt.

In den folgenden Unter-Kapiteln (3.3.1-3.3.4) wird die Arbeit mit paramagnetischen Partikeln vorgestellt. Ziel war es zunächst, Bedingungen zu finden unter denen Hexahistidyl-markiertes Lhcb1 an die Magnetpartikel binden kann (Kapitel 3.3.2), um das Protein dann auch vor, während oder nach einer Thylakoid-Insertionsreaktion (Kapitel 3.3.3 und 3.3.4) an solche Partikel binden zu können. Mit dieser Methode sollten Wechselwirkungen des gebundenen Lichtsammelproteins mit stromalen oder thylakoidalen Faktoren aufgeklärt werden. Das Konzept bestand darin, Thylakoid-Vesikel über die Wechselwirkung mit Lhcb1 anzureichern, und zwar nur solche Vesikel, die wichtige Komponenten (Rezeptor?) für den Lhcb1-Membraneinbau enthalten. Dazu wurde Lhcb1 mit "His-Tag" an Magnetpartikel gebunden. Verwendet wurde C-, sowie N-terminal markiertes Protein (C3.2h und 44C.3). Im folgenden Kapitel (3.31) wurden mit Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) gekoppelte paramagnetische Dextranpartikel (Nanomag-D, micro-cap, Rostock) mit Ni^{2+} beladen und die Bindekapazität für Nickel bestimmt (Kapitel 3.3.1). Diese Partikel wurden speziell für die Arbeitsgruppe hergestellt, daher lagen noch keine Daten über die Metall-bindenden Eigenschaften vor.

3.3.1 Bestimmung der Ni^{2+} -Bindekapazität für paramagnetische Dextranpartikel

Mittels der Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS, FMD3, Zeiss) wurde die Extinktion einer NiCl_2 -Stammlösung und weiterer Verdünnungsstufen gemessen. Ziel war es, über die Eichreihe die Bindekapazität paramagnetischer Dextranpartikel für Ni^{2+} zu ermitteln. Die Messung erfolgte bei der Resonanzwellenlänge von 232 nm und einer Spaltbreite von 0,2 nm. Bei 232 nm wurde die Änderung der Extinktion mit Hilfe eines Schreibers aufgezeichnet. Als Berechnungswert diente der mittlere Schreiberausgang während der Messung. Bei den Proben (P1-P3) handelte es sich um die Eluate der zu untersuchenden paramagnetischen Dextranpartikel Nanomag-D (micro-cap). Die Partikel waren vor der eigentlichen Elution der Nickelionen mit unterschiedlicher Stringenz gewaschen worden:

2 x mit 200 μl , 1 x 500 μl	10 mM Tris-HCl, pH 8	= P1
2 x mit 200 μl	10 mM Tris-HCl, pH 8	= P2
2 x mit 100 μl	10 mM Tris-HCl, pH 8	= P3

Die Nickelionen wurden mit 2 x 100 μl 0,5 M EDTA von den Partikeln eluiert. Auch reine EDTA-Lösung wurde vermessen, um eine Absorption dieses Elutionsmittels bei 232 nm auszuschließen. Die Proben wurden vor der Messung jeweils 1:10, 1:40 und 1:160 verdünnt. Der Nickelgehalt der Proben wurde mit Hilfe der Eichreihe bestimmt (siehe auch Kapitel 2.6).

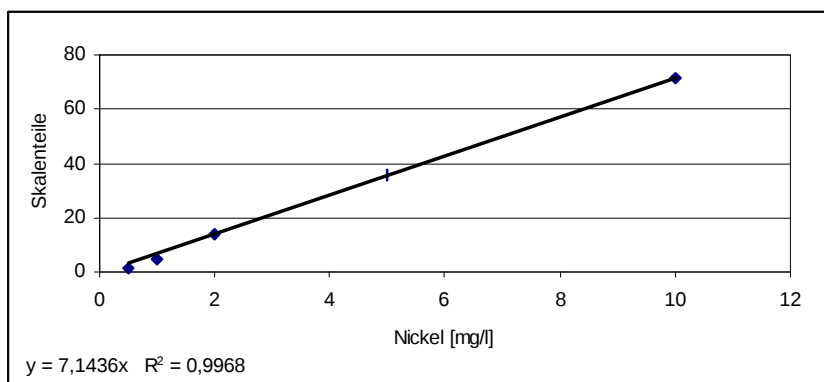


Abbildung 3.3-1 Eichreihe einer Nickelchlorid Lösung. Die Datenpunkte der Eichreihe entsprechen dem mittleren Schreiberausgang (Skalenteile) der NiCl_2 -Verdünnungsreihe

Ni ²⁺ [mg/l]	Skalenteile
10,0	72,0
5,0	36,0
2,0	14,0
1,0	4,8
0,5	1,3

Tabelle 3.3-1 Mittlerer Schreiberausschlag des AAS mit der Ni²⁺-Verdünnungsreihe

Verdünnungs- faktor	10	40	160	Mittel- wert	Standard- abweichung	Gebundenes Ni ²⁺ [nmol/mg]
Skalenteile P1	28,5	7,2	1,7			
Ni [mg/l]	40,16	40,60	38,33	39,69	1,20	67,61
Skalenteile P2	32,0	8,5	2,0			
Ni [mg/l]	45,09	47,91	45,09	46,03	1,63	78,41
Skalenteile P3	33,5	8,7	2,0			
Ni [mg/l]	47,20	49,04	45,09	47,11	1,97	80,25

Tabelle 3.3-2 Bestimmung der Ni²⁺-Bindekapazität von Nanomag-D Magnetpartikeln. Als

Probe diente das Eluat von 2 mg Partikeln (eluiert mit 200 µl 0,5 M EDTA). Diese wurde zunächst verdünnt und dann vermessen. Die Änderung des Schreiberausschlags über die Meßzeit diente als Datenpunkt, der mit der Eichreihe verglichen wurde. Die Nickelkonzentration der Probe und die damit verbundene Bindekapazität der Partikel wurde mit folgenden Formeln ermittelt.

Ni²⁺-Konzentration der Probe [mg/l] = (Skalenteile Probe / 7,1436) x Verdünnungsfaktor

Ni²⁺-Bindekapazität der Partikel [nmol/mg] = (Ni²⁺ µg x 1000 nmol) / (1000 µl x 2 mg x 58,7 µg)

Je stringenter die Partikel gewaschen wurden, desto weniger Ni²⁺ wurde im Eluat gefunden. Für die am stringentesten gewaschene Probe (P1) ergab sich damit eine Ni²⁺-Bindekapazität der Nanomag-D Dextranpartikel von 67,61 nmol/ mg. Die Nickelbindung lag höher, als die geschätzten Angaben des Herstellers von ca. 25 nmol geladene Gruppen pro mg Partikel.

3.3.2 Bindung Hexahistidyl-markierter Lhcb1-Derivate an paramagnetische Partikel

Es sollten Bedingungen getestet werden, unter denen Histidin-markiertes Protein an unterschiedliche Magnetpartikel binden kann. Weiterhin sollte die Spezifität der Bindung an den Hexahistidyl-Rest überprüft werden. Ni²⁺-DTPA-Partikel (microcaps) eigneten sich nicht zum Binden der Hexahistidyl-markierten Proteine (Gele nicht gezeigt). Wahrscheinlich hatte DTPA alle 6 Valenzen des Nickels gebunden und somit waren keine freien Koordinationsstellen für das Histidin übrig. Dafür sprach auch die mit dem AAS ermittelte relativ hohe Immobilisierung von Ni²⁺. Diese lag mit etwa 68 nmol/mg Partikel über den vom Hersteller geschätzten Angaben (25 nmol/mg). Daraufhin wurden der Arbeitsgruppe NTA-gekoppelte Partikel zur Verfügung gestellt (mit Vierfach-Koordination).

Die Ni^{2+} -Bindekapazität wurde nicht erneut bestimmt, da NTA bereits als guter Chelatbildner für Nickel etabliert ist.

Die Bindkonstanten betragen:

$$\text{Ni}^{2+}/\text{NTA } 3,162 \times 10^{11}/\text{M}^{-1} \quad \text{His}_2/\text{Ni}^{2+} 7,94 \times 10^8/\text{M}^{-1}.$$

In einem Vorversuch wurde zunächst getestet, wieviel Hexahistidin-markiertes Protein an die bereits mit Co^{2+} beladenen Xenopore NTA-Magnetpartikeln gebunden werden kann (ohne Abbildung). Es wurden 20-, 40-, 80- und 150 μg Magnetpartikel mit 6 μg Protein (Klon C3.2h) inkubiert, gewaschen und eluiert. Die Überstände der Lösungen wurden aufbewahrt und in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Der Verbleib des Proteins wurde durch eine Coomassie Blau-Färbung des Gels überprüft. Wurden 20- und 40 μg Partikel verwendet, verblieb jeweils der größte Teil des Proteins im Überstand. Mit 80 μg Partikeln konnte man eine Abnahme des Proteins aus dem Überstand um etwa 1/3 der eingesetzten Proteinmenge beobachten. 150 μg Partikel hatten bereits etwa 3/4 der eingesetzten Proteinmenge gebunden. Die Wiederholung des Versuchsansatzes mit 150 μg Magnetpartikeln und 6 μg Protein lieferte das gleiche Ergebnis (siehe Abbildung 3.3-3).

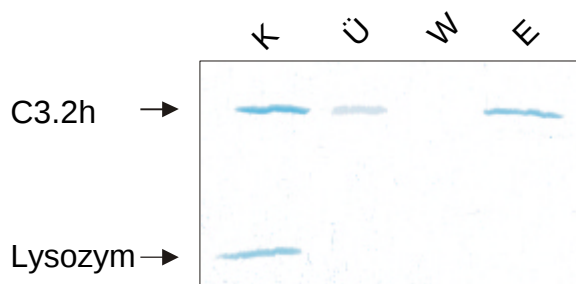


Abbildung 3.3-3 Bindekapazität Hexahistidin-markierter Proteine an Metall-gesättigte paramagnetische Partikel.

150 μg (15 μl) gewaschene, paramagnetische Co^{2+} -beladene NTA-LOP-Partikel (Xenopore) wurden mit 6 μg Protein (100 $\text{ng}/\mu\text{l}$, Klon C3.2h) für 30 Min bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde abgehoben und die Partikel mit Waschlösung (60 μl) gewaschen. Die Partikel wurden mit Elutionspuffer (60 μl) versetzt und 20 Min bei 37 °C inkubiert. Pufferzusammensetzung, siehe Material und Methoden Kapitel 2.6). Von allen Überständen wurden 20 μl auf ein denaturierendes SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und anschließend mit Coomassie Blau gefärbt (siehe auch Kapitel 2.2.4). Ü = Überstand; E = Eluat; W = Waschfraktion; K = Kontrollprotein (20 μl -Aliquot des eingesetzten Proteins in Bindepuffer).

Aus dem Versuch (Abbildung 3.3-3) ergab sich eine Bindekapazität von 30 μg Hexahistidin-markiertem Lichtsammelprotein pro 1 mg Partikel oder entsprechend 1,1 nmol/mg Partikel (für $M_{\text{Protein}} = 27000$). Die Waschfraktionen enthielten kein Protein. Für die Beurteilung der Bindspezifität ist es von Bedeutung zu erwähnen, daß Lysozym unspezifisch an die Partikel gebunden wurde. In diesem Versuch tauchte das Lysozym im Eluat nicht wieder auf. Dies ist sehr erstaunlich, da das markierte Protein eigentlich spezifischer gebunden und eluiert werden sollte als Lysozym.

Aus Abbildung 3.3-4 wird ersichtlich, daß sowohl die Co^{2+} -beladenen Latexpartikel LOP (Xenopore), als auch die Ni^{2+} -beladenen Dextranpartikel Nanomag-D (micro-cap) das Histidin-markierte Protein vollständig gebunden hatten (0,617 nmol Protein/mg Partikel). Dies war für die Latexpartikel (Xenopore) zu erwarten, da im Vorversuch bereits eine Bindekapazität von

1,1 nmol/mg für das Histidin-markiertes Protein bestimmt worden war. In diesem Fall konnte erneut beobachtet werden, daß die Xenopore-Partikel unspezifisch Lysozym aus der Proteinsuspension gebunden hatten. Bei den Nanomag-Partikeln verblieb das Lysozym im Überstand. Das Waschen der Partikel führte bei beiden Partikel-Arten nicht zu einem Verlust an gebundenem Protein. Allerdings ergaben sich Probleme bei dem Versuch, das Protein überhaupt wieder von den Partikeln abzulösen. Mit dem hier verwendeten Elutionspuffer (siehe Kapitel 2.6.2) konnte das Protein von den Nanomag-Partikeln nicht wieder entfernt werden. Dagegen ließ sich von den Xenopore-Partikeln ca. die Hälfte der eingesetzten und gebundenen Proteinmenge wieder eluieren (ca. 1,2 µg von 2,5 µg Kontrollprotein). Im Eluat tauchte in diesem Fall auch Lysozym wieder auf, was in Abbildung 3.3-3 nicht zu erkennen war.

Die Nanomag-D-Partikel wurden im Anschluß an den Versuch noch einmal mit einem veränderten Puffer (300 mM NaCl, 100 mM NaH₂PO₄, 300 mM Imidazol, 1% SDS; 10mM Tris-HCl, pH 7,5; 2 x 15 µl) behandelt, um zu testen, ob das gebundene Protein auf diese Weise eluiert werden kann. Unter den modifizierten Versuchsbedingungen und einer Inkubation bei 45 ° C war eine Abtrennung des Proteins von den Partikeln erfolgreich. Die Proteinmenge wurde jedoch nicht weiter quantifiziert, da die Eluate zur rein qualitativen Analyse auf einem Silber gefärbten Gel aufgetragen worden waren. Diese Gele eignen sich nicht für eine Proteinquantifizierung.

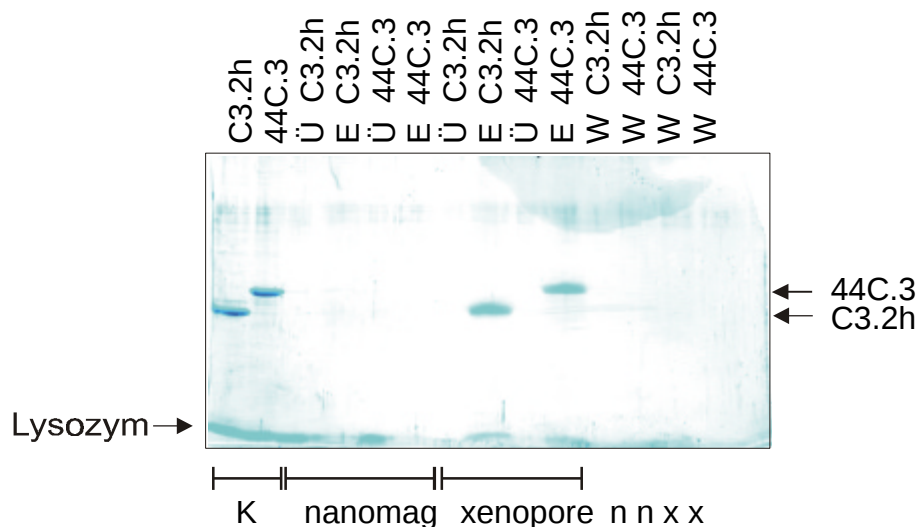


Abbildung 3.3-4 Vergleich verschiedener paramagnetischer Partikel in Bezug auf Bindung und Elution Hexahistidin-markierter Proteine.

Je 300 µg (30 µl) Metall-beladene und gewaschene paramagnetische Partikel (Nanomag-D Dextranpartikel, Ni-NTA-beladen; Xenopore NTA-LOP-Partikel, Co²⁺-NTA beladen) wurden mit 5 µg Protein (166 ng/µl, Klone C3.2h bzw. 44C.3) für 20 Min bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde abgehoben und die Partikel in Waschpuffer (30 µl) gewaschen. Die Partikel wurden mit Elutionspuffer versetzt (30µl) und weitere 20 Min bei 37 °C inkubiert (2 x 15 µl). Von allen Überständen wurden 15 µl Lösung in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (siehe auch Kapitel 2.2.3) Ü = Überstand; E = Eluat; W = Waschfraktion; n = Nanomag-D Partikel; x = Xenopore LOP Partikel; K = Kontrollprotein (15 µl-Aliquot der eingesetzten Proteinmenge in Bindepuffer)

3.3.3 Bindspezifität von Magnetpartikeln in Stromaextrakt

Die Ergebnisse aus den vorausgegangenen Versuchen hatten gezeigt, daß Lysozym unspezifisch an Latex-Magnetpartikel (LOP, Xenopore) gebunden wurde. Die Isolation bestimmter Thylakoid-Vesikel, also solcher Vesikel die mit Hexahistidyl-Lhcb1 assoziiert sind, würde nicht funktionieren, wenn verschiedene Chloroplasten-Proteine (vor allem Thylakoid-assoziierte) unspezifisch an die Partikel binden. Daher wurde zunächst untersucht, ob die Magnetpartikel spezifisch Hexahistidyl-markiertes Lhcb1 binden können, ohne dabei unspezifisch Proteine aus einem Proteingemisch (in diesem Fall Stromaextrakt) zu binden. Weiterhin sollte mit diesem Experiment spezifische Wechselwirkungen zwischen Partikel-gebundenem Lhcb1 und stromalen Faktoren untersucht werden. Für eine Detektion sind daher stabile und ausreichend starke Wechselwirkungen wünschenswert. Die Versuche aus Abbildung 3.3-4, wurden mit beiden Partikel-Arten durchgeführt. Gezeigt sind jedoch nur die Ergebnisse aus der Arbeit mit den Ni-NTA-beladenen Nanomag Dextranpartikeln, da beide Versuchsreihen vergleichbare Ergebnisse lieferten. C-, sowie N-terminal markiertes "His-Tag"-Lhcb1 (C3.2h und 44C.3) wurde an Magnetpartikel gebunden und für den Versuch verwendet.

Abbildung 3.3-5 zeigt, daß His₆-Lhcb1 fast vollständig an die Partikel gebunden wurde. Dies zeigt der Vergleich der eingesetzten Proteinmenge (K, 44C.3 und C3.2h wurden zusammen aufgetragen) mit den Proteinüberständen (Ü1-1 und Ü1-2). Nach der Inkubation der Partikel mit Stromaextrakt war in den Überständen Stroma-Protein verblieben. Das Partikel-gebundene Lhcb1 wurde durch die Inkubation mit Stroma nicht abgewaschen. Obwohl von den Waschfraktionen (W4) vergleichbar mehr Probe aufgetragen wurde, erschien weniger Protein in den Gelspuren. Mit Elutionspuffer1 wurde weniger Protein eluiert als mit Elutionspuffer2; letzterer war mit den Salzen NaCl und NaH₂PO₄ versetzt (Zur Zusammensetzung siehe Material und Methoden Kapitel 2.6.2). Hier wurden vergleichbare Aliquots auf das Gel aufgetragen. Mit dem zweiten Elutionspuffer wurde auch Lhcb1 eluiert (Bahn E2-1: 44C.3 und Bahn E2-3: C3.2h.). Die Bandenintensitäten der eluierten Lhcb1-Proteine verglichen mit den Intensitäten, der gebundenen Proteine (K, sowie Ü1-1 und Ü1-2), deuteten darauf hin, daß weniger Protein von den Partikeln eluiert wurde, als zuvor gebunden worden war. Trotz des Waschschrittes, der nach der Inkubation der Partikel mit Stroma erfolgt war, traten in den Eluat eine ganze Reihe verschiedener Proteine auf. Bis auf wenige Ausnahmen spiegelte sich fast das komplette Spektrum der gefärbten Banden aus der Stroma-Kontrolle in den Eluat wieder. Dies deutet auf eine unspezifische Bindung der Proteine an die Partikel. In der Zusammensetzung der Proteinmischungen, die von den His₆-gebundenen oder Protein-freien Partikeln eluiert wurden, konnte kein qualitativer Unterschied festgestellt werden. Es konnte kein Protein detektiert werden, das nur im Eluat der His₆-Lhcb1-beladenen Partikel aufgetreten war. Ein Hinweis auf eine spezifische Wechselwirkung zwischen Lhcb1 und bestimmten Proteinen der Stroma-Fraktion konnte damit nicht erbracht werden. Das aus der Einschlußkörper-Isolation stammende Lysozym verblieb, wie bei diesen Partikeln bereits festgestellt wurde (Abbildung 3.3-4), im Proteinüberstand. Ganz ähnliche Ergebnisse lieferte das Experiment mit den Xenopore Latex-LOP-Partikeln, die Co²⁺ über NTA gebunden hatten. Auch hier wurde eine ganze Reihe an Proteinen unspezifisch an die Partikel gebunden (ohne Abbildung).

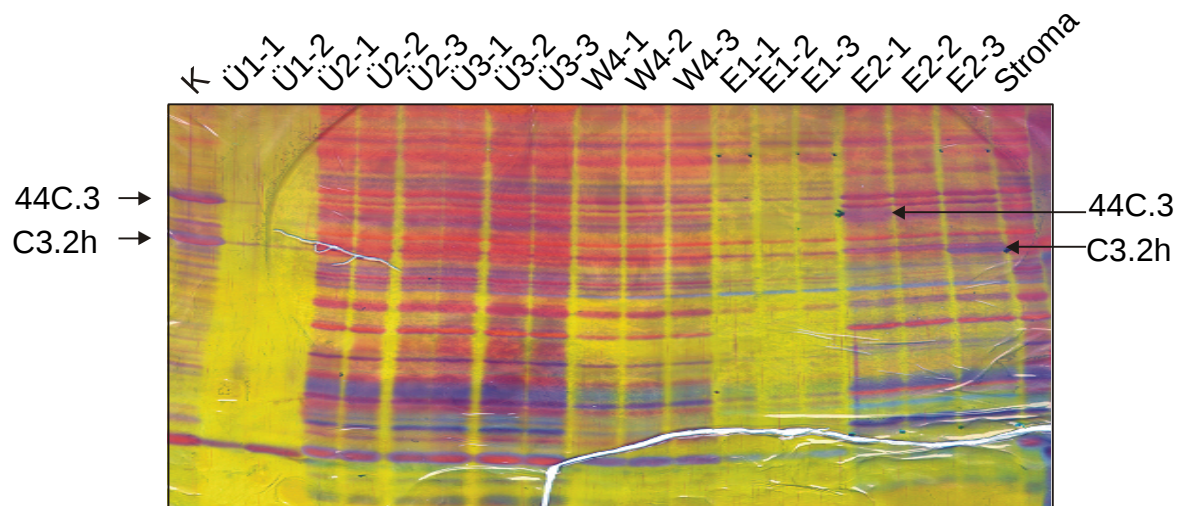


Abbildung 3.3-5 Proteine aus dem Chloroplastenstroma binden unspezifisch an Ni-NTA-beladene Nanomag-D Dextranpartikel.

Je 150µg Nanomag-D Dextranpartikel, Ni-NTA-beladen wurden mit je 4 µg 44C.3 (jeweils Probe –1), C3.2h (jeweils Probe –3); und ohne Protein (jeweils Probe –2) in 30µl Bindepuffer für 10 Min bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen (Ü1), und 1/3 wurde auf das SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Partikel wurden mit 10 µl Stroma (100 µg Protein) abgespült, der Überstand (Ü2) 1:10 verdünnt und 2µl (1/50) auf das Gel aufgetragen. Dieser Vorgang wurde wiederholt, mit der Ausnahme, daß die Proben 10 Min inkubiert wurden (Ü3). Anschließend wurden die Partikel mit 20 µl Insertionspuffer gewaschen und 1/16 der Probe auf das Gel aufgetragen (W4). Die Partikel wurden schließlich mit 20 µl Elutionspuffer1 (10 Min, RT; E1) und Elutionspuffer2 (10 Min, 37 °C; E2) behandelt. Es wurde weiterhin 1/50 der eingesetzten Stromamenge als Kontrolle aufgetragen (Stroma). Von den Eluaten wurde 1/3 auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde nach der Elektrophorese mit Silber gefärbt. Ü = Überstand; E = Eluat; W = Waschfraktion; K = Kontrolle (1/3 des eingesetzten Proteins). Zu Puffer-Zusammensetzungen und Silber-Färbung siehe Material und Methoden, Kapitel 2.6.2 und 2.2.5.

3.3.4 Magnetpartikel-gebundenes His₆-Lhcb1 unter Insertionsbedingungen

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.3.3 zeigen, daß stromale Proteine unspezifisch an Nanomag-D Partikel gebunden wurden. Trotzdem sollte weiter getestet werden, ob unter Bedingungen, bei denen rekombinantes Lhcb1 in isolierte Thylakoide inseriert wird, eine Anreicherung Lhcb1-assoziiierter Thylakoid-Vesikel erzielt werden kann. Dazu wurde Lhcb1 mit "His-Tag" an Magnetpartikel gebunden. Verwendet wurde C-, sowie N-terminal markiertes Protein (C3.2h und 44C.3). Zur Kontrolle wurden die Partikel eines Reaktionsansatzes zuvor mit L-Histidin gesättigt, ein weiterer Ansatz wurde ohne Protein inkubiert.

Ähnlich wie in Versuch 3.3.3 wurde fast das gesamte Histidin-markierte Protein an die Partikel gebunden (Abbildung 3.3-5). Vom Lysozym verblieb der größte Teil im Überstand. In den Überständen aller Waschfraktionen (Ü4-Ü6) wurde sowohl Thylakoid-, als auch Stroma-Protein sichtbar (vergleiche die Banden der Thylakoid-, bzw. Stroma-Kontrolle). Mit Elutionspuffer 1 veränderte sich das Proteinmuster des Überstands zunächst etwas. Das meiste Protein wurde jedoch durch Zugabe von Elutionspuffer 2 von den Partikeln gewaschen. Auch nach einer zweiten Behandlung der Partikel mit diesem Puffer wurden weitere Proteine eluiert.

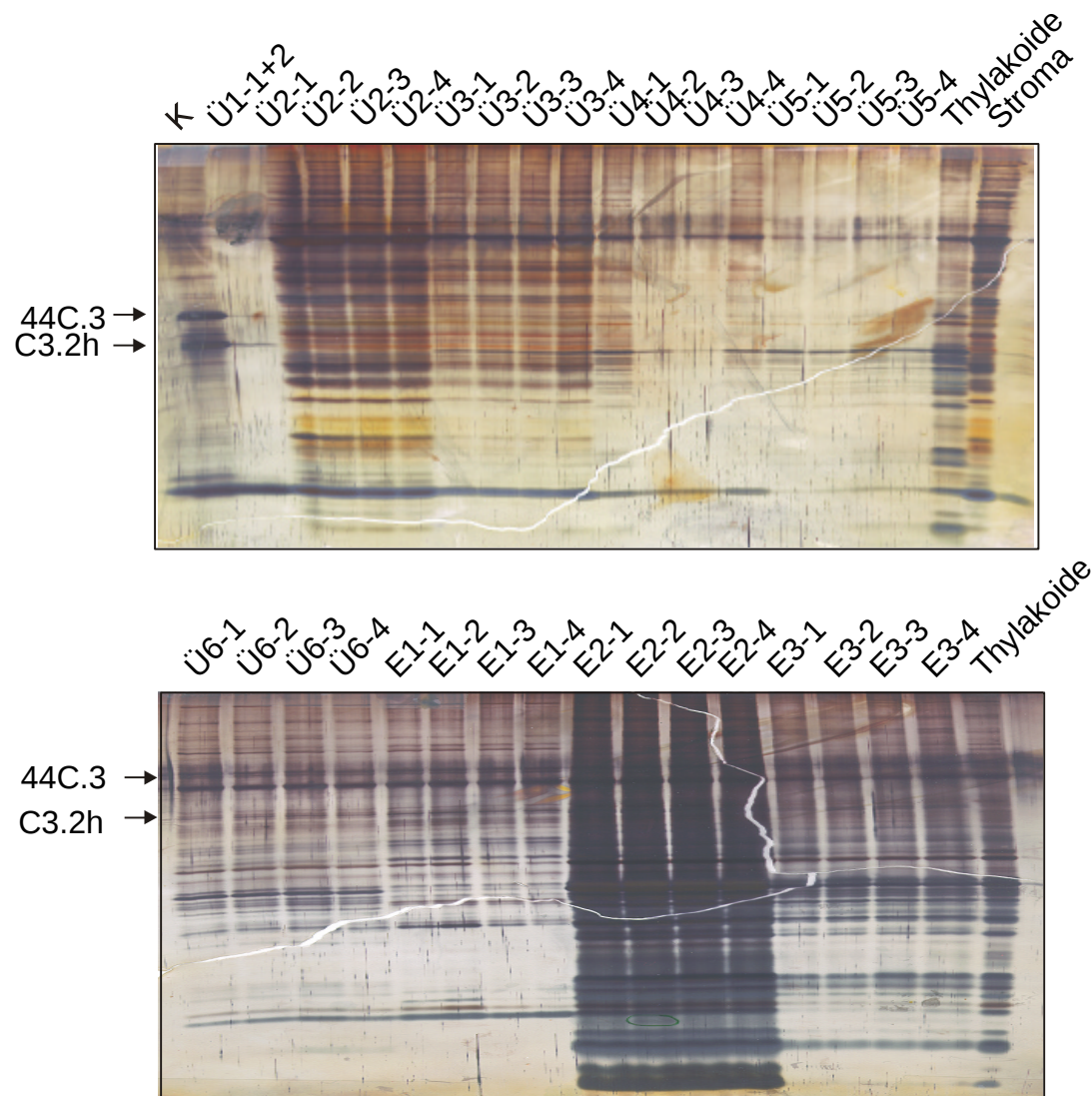


Abbildung 3.3-6 Thylakoidkomponenten binden unspezifisch an Ni-NTA-beladene

Nanomag-D Dextranpartikel. Je 150µg Nanomag-D Dextranpartikel, Ni-NTA-beladen wurden mit je 4 µg 44C.3 (jeweils Probe –1), 4 µg C3.2h (jeweils Probe –2); 166mM L-Histidin (jeweils Probe –3), oder ganz ohne Zugabe von Protein/Histidin (jeweils Probe –4) in 30µl Bindepuffer für 10 Min bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen (Ü1), und 1/3 wurde auf das SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Partikel wurden dann mit 10 µl Stroma (100 µg Protein) abgespült, der Überstand (Ü2) wurde 1:10 verdünnt und 2µl (1/50) auf das Gel aufgetragen. Dann wurden sämtliche Komponenten eines Insertionsansatzes (Stroma, Mg-ATP, Puffer, Thylakoide; siehe Material und Methoden, Kapitel 2.5.2) zugegeben, und für 30 Min unter Beleuchtung inkubiert. Der Ansatz wurde 1:2 mit Insertionspuffer verdünnt, und 1/1000 der Probe auf das Gel aufgetragen (Ü3). Anschließend wurden die Partikel 3 x mit Insertionspuffer gewaschen und 1/60 (Ü4 + Ü5) und 1/8 (Ü6) der Probe auf das Gel aufgetragen. Die Partikel wurden schließlich mit 20 µl Elutionspuffer 1 (10 Min, RT; E1) und 2 x mit Elutionspuffer 2 (10 Min, 37 °C; E2) behandelt. Von den Eluaten wurde 1/4 auf das Gel aufgetragen. Zur Kontrolle wurde weiterhin 1/50 der eingesetzten Stromamenge (Stroma) und 1/85 der eingesetzten Thylakoide aufgetragen. Das Gel wurde mit Silber gefärbt. Ü = Überstand; E = Eluat; K = Kontrolle (1/3 des eingesetzten Proteins, 44C.3 und C3.2h wurden in einer Tasche aufgetragen). Zu Pufferzusammensetzungen und Silberfärbung siehe Material und Methoden, Kapitel 2.6.2 und 2.2.5.

Im Gegensatz zu Versuch 3.3.3, bei dem keine Thylakoide im Ansatz verwendet wurden, konnte hier weder 44C.3 noch C3.2h in den Eluaten detektiert werden. Wahrscheinlich ist hier das Protein durch eine Thylakoid-gebundene Protease abgebaut worden, denn mit Elutionspuffer 2 war in Versuch 3.3.3 rekombinantes Protein von den Partikeln abgelöst worden. Dies deutet auch darauf hin, daß weder C-terminal noch N-terminal Hexahistidyl-markiertes Protein in die Thylakoide eingebaut wurde. Vergleichbar mit Versuch 3.3.3 war, daß keine spezifischen Protein-Bindungen an die Partikel erfolgt waren. Das Bandenmuster der einzelnen Wasch- und Elutions-Fraktionen war bei den verschiedenen Proben stets sehr ähnlich. Kein Protein trat nur in den Eluaten der mit Lhcb1-Protein inkubierten Proben auf, so daß eine Wechselwirkung von Lhcb1 mit einem bestimmten Protein nicht nachgewiesen werden konnte. Daher wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

3.4 Insertion Hexahistidyl-markierter Lhcb1-Derivate in isolierte Erbsenthylakoide

Mit den Rekonstitutionsexperimenten aus Kapitel 3.2 konnte gezeigt werden, daß eine Verlängerung von Lhcb1 mit einem Hexahistidyl-Rest die Faltung der Proteine zum LHCII nicht beeinflußt. Dabei spielte es auch keine Rolle, an welcher Position des Proteins dieser "His-Tag" eingebracht worden war. Nur Klon D7AH2 zeigte eine leichte Komplex-Instabilität im schwach denaturierenden Gel. Nun stellte sich die Frage, ob ein solcher "His-Tag" auch die Wechselwirkungen von Lhcb1 mit den Zielsteuerungs- und Assemblierungs-Apparaten des Chloroplasten nicht störten. Die folgenden Insertionsexperimente sollten darüber Aufschluß geben. Zunächst wurden die Proteine auf ihre Fähigkeit getestet, stabil in isolierte Thylakoide zu inserieren (Abbildung 3.4-1). Die Methode der Lhcb1-Insertion ist in Kapitel 2.5 beschrieben.

Werden Pigment-Protein Komplexe solubilisierter Erbsenthylakoide in einem schwach denaturierenden Gel aufgetrennt, so findet man in der Regel zwei Oligomerisierungszustände des LHCII: schneller wandernde LHCII-Monomere und langsamer wandernde LHCII-Trimere. Aufgrund der Instabilität des Photosystems II (PSII) findet man in einem solchen Gelsystem keine PSII-Superkomplexe. Die entsprechenden Apoproteine stabil inserierter trimerer und monomerer Pigment-Protein Komplexe des LHCII lassen sich aufgrund ihrer differentiellen Protease-Sensitivität in einem voll denaturierenden Gel voneinander unterscheiden. Durch die Protease-Behandlung werden die Lichtsammelproteine um ein Protease-sensitives Fragment am N-Terminus verkürzt. Je nach Oligomerisierungszustand sind stabil eingebaute Komplexe unterschiedlich vor dem Verdau durch die Protease geschützt.

Die Abbau-, oder Degradationsprodukte (DP und DP*) wurden dabei als stabil inserierte Lichtsammelproteine identifiziert: DP, mit etwa 24 kDa, korrespondiert mit dem Abbauprodukt trimerer Lichtsammelproteine; LHCII-Monomere, die weniger Protease-geschützt sind werden zu DP* mit etwa 20 kDa abgebaut (Kuttkat *et al.*, 1995) (siehe auch Abbildung 3.4-1, Gele A und B jeweils Spuren 1 und 6, Lhcb1 und pLhcb1).

Vergleicht man die Insertionsprodukte der Histidin-markierten Lichtsammelproteine aus Abbildung 3.4-1, so konnte zunächst festgestellt werden, daß alle markierten Proteine in isolierte Erbsenthylakoide inserierten. Die Proteine zeigten jedoch ein unterschiedliches Insertions- und Oligomerisierungs-Verhalten, je nach Position des eingeführten "His-Tags". Klon 44C.3, mit dem "His-Tag" am äußeren N-Terminus des Signalpeptids, zeigte eine mit dem nicht veränderten pLhcb1-Kontrollprotein, 42.g1, vergleichbar starke Insertionseffizienz (Spuren 5 und 6). Auch die Trimerisierungskompetenz blieb bei diesem Klon vollständig erhalten. In manchen Experimenten tauchte bei diesem Histidin-markierten Klon nicht verdautes Protein in der Gelspur auf. Dies deutete darauf hin, daß das markierte Protein dazu neigte, Aggregate zu bilden, die für einen Verdau durch die Protease unzugänglich waren. Die verdauten Insertionsprodukte des Klons C3.2h, einem Lhcb1-Klon mit sechs Histidin-Resten am C-Terminus, wanderten sowohl mit Lhcb1 Monomeren, als auch mit Lhcb1 Trimeren (Gel A, Spur 3). Auch die Abbauprodukte DP und DP* traten auf, wenn auch im Vergleich zu den Wildtypproteinen, mit etwas geringerer Mobilität. Die langsamere Wanderungsgeschwindigkeit ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die Histidin-Verlängerung auch nach dem Protease-Verdau der Thylakoide noch am Protein verblieb. Die Signale der Insertionsprodukte waren stets sehr schwach, verglichen mit den Insertionsprodukten des Wildtyp Lhcb1. Die Einführung des Hexahistidyl-Restes verursachte eine Abnahme in der Insertions-Effizienz. Zum Teil wurde auf der Gelspur des Klons C3.2h neben den Insertionsprodukten DP und DP* (Gel B) auch unverdautes Protein gefunden. Auch tauchten gelegentlich zusätzliche Abbauprodukte auf, die jedoch, wie das unverdaute Protein auch, höchstwahrscheinlich auf aggregiertes, nicht stabil inseriertes Protein zurückzuführen waren (siehe Abbildung 3.4-4 und 3.4-2 Insertion ohne Stromaextrakt). Unverdautes Volllängenprotein wurde durch den Vergleich mit einem Marker nachgewiesen (Einschlußkörper der verwendeten Klone). Die Insertionsprodukte des Klons C2.4h, der pLHCP-Variante des Klons C3.2h sind mit diesem vergleichbar. Auch hier war die Menge des eingebauten Proteins stets geringer, als die des nicht Histidin-markierten Kontrollproteins. Ein Teil des eingebauten Proteins war ebenfalls noch in der Lage, Trimere zu bilden.

D7AH2, mit einer Hexahistidyl-Verlängerung in der stromalen Schleife zwischen der zweiten und dritten Transmembran-Helix (Position Prolin¹⁴⁷), wanderte sowohl im schwach denaturierenden als auch im denaturierenden Gel immer höhermolekular als der entsprechende unmarkierte Lhcb1-Klon und auch etwas höhermolekular, als alle anderen LHCP-Klone mit Hexahistidyl-Verlängerung. Die Sequenzierung dieses Klons hatte jedoch gezeigt, daß das DNA-Stück, wie gewünscht, nur einmal integriert worden war. Somit ist das Laufverhalten lediglich mit einem Positionseffekt der Hexahistidyl-Verlängerung erklärbar. Die Stärke des radioaktiven Signals, das mit der Insertion von D7AH2 erreicht werden konnte, wies auf eine weniger gute Insertionsrate dieses Proteins im Vergleich mit den nicht markierten Proteinen pLhcb1 und Lhcb1 hin. Eine Trimerisierung des Proteins konnte bei diesem Klon in diesem Versuch beobachtet werden (Spur 2, Gel A). Nicht immer konnten jedoch nach der Gelelektrophorese stabil inserierte Trimere nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 3.4-4). Der Klon zeigte schon in den Rekonstitutionsexperimenten eine Instabilität in Bezug auf die Pigment-bindenden Eigenschaften (Kapitel 3.2). Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß dies auch die Fähigkeit des Proteins stabile Trimere auszubilden beeinflußt haben könnte. Diese Annahme wird dadurch gestützt, daß am gleichen Versuchstag eine sehr schwache Trimer-Bande auch bei der Trimerisierungs-Mutante, WY16,17AV auftrat. Bei dieser Mutante ist das Trimerisierungs-Motiv WYXXXR an Position 16-21 verändert: Die Aminosäuren Tryptophan (W) und Tyrosin (Y) an den Positionen 16 und 17 wurden durch die Aminosäuren Alanin (A) und Valin (V) ersetzt (Hobe *et al.*, 1995). Nur unter besonders milden Insertionsbedingungen konnte man bei dieser Lhcb1-Mutante eine Trimerisierung beobachten.

D7PH11 trägt sechs Histidin-Reste an Position Ala⁵³. Diese Position liegt im LHCII N-proximal auf der stromalen Seite, nahe der ersten Transmembran-Helix. Diese Mutante bildete in keinem Insertionsexperiment Trimere. Das Protein konnte jedoch stets mit einer hohen Effizienz, vergleichbar mit der des nativen Proteins inseriert werden. Zum Teil trat DP* als Doppelbande auf. Das schneller wandernde Abbauprodukt repräsentiert dabei sehr wahrscheinlich das stabil inserierte Protein. Die obere, langsamer wandernde Bande trat immer dann verstärkt auf, wenn die Insertion gestört war (Abbildung 3.4-2, 3.4-3 und 3.4-4).

Die Effizienz der Insertion bei den C-terminal markierten Klonen war also am stärksten herabgesetzt. Die Fähigkeit, Trimere auszubilden, blieb bei allen Derivaten, mit der Ausnahme des Klons D7PH11, erhalten.

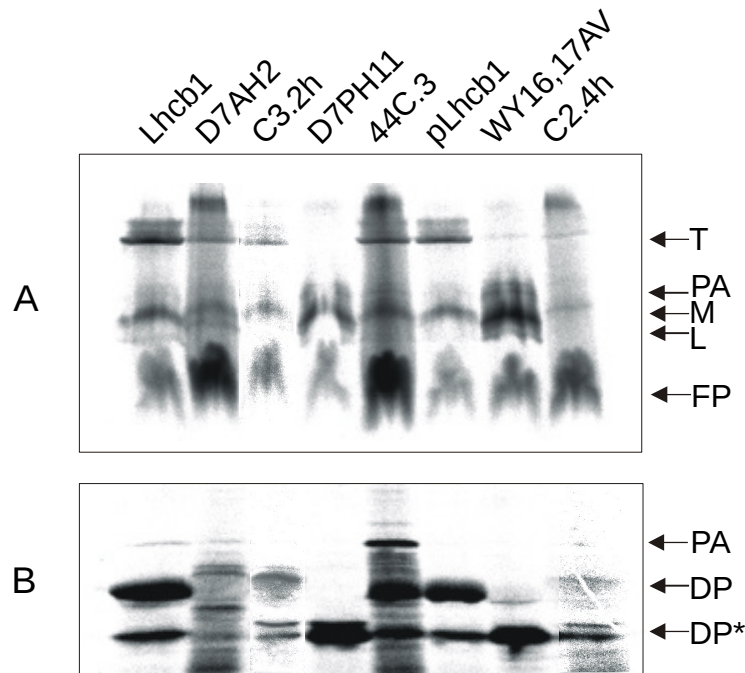


Abbildung 3.4-1 Die Position der Histidin-Markierung beeinflusst sowohl die Insertionseffizienz, als auch die Oligomerisierung inserierter Lichtsammelproteine. Je Klon (Bezeichnungen, siehe Abbildung 3.1-1) wurden 5×10^5 cpm radioaktiv markiertes Protein in einem Standard-Insertionsansatz inseriert. Pro Insertion wurden 1,3 mg Stromaprotein eingesetzt. **A:** Membranen von 1/4 Insertionsansatz (8,5 µg Chlorophyll) wurden nach der Thermolysin-Behandlung der Thylakoide in einem schwach denaturierenden Gel aufgetrennt und fluorographisch dokumentiert. **B:** Die Proteine von 1/3 Insertionsansatz (11,3 µg Chlorophyll) wurden nach der Thermolysin-Behandlung der Thylakoide gefällt, in einem denaturierenden Gel aufgetrennt und fluorographisch dokumentiert. Expositionsdauer: 2,5 d; FP = freies Pigment; L = freies, unkomplexiertes Protein; M = monomere Komplexe; PA = Proteinaggregate, die der Thermolysin-Behandlung nicht oder nur bedingt zugänglich waren; dieses Protein war nicht stabil inseriert worden; T = trimere Komplexe; DP* = Degradationsprodukt monomerer Komplexe; DP = Degradationsprodukt trimerer Komplexe.

Histidin-markiertes Protein neigte stets zur Aggregation. In Harnstoff lösten sich Histidin-markierte Proteine schlechter als nicht Histidin-markierte Proteine (Lhcb1 ca. 0,35 mg/ml 8 M Urea / z.B. Klon D7AH2 0,2 mg/ml 8 M Urea, ohne Abbildung). Die Ursache für die schlechtere Löslichkeit Histidin-markierter Proteine könnte darin begründet liegen, daß sie wegen der eingeführten Histidin-Reste Komplexe mit freien Metallionen bilden und damit schneller aggregieren. Vorstellbar wäre auch, daß mehrere Proteine Kreuzverknüpfungen über die Metallionen eingehen. Mit freiem L-Histidin, das im Vergleich zum Lichtsammelprotein im 50-fachen Überschuß zum Insertionsansatz gegeben wurde (5mM L-Histidin : 100 nM Protein), sollten solche Aggregationen verhindert werden können (Abbildung 3.4-2). Die Kontrollinsertion mit Wildtyp pLhcb1 sollte zeigen, ob freies L-Histidin schon Auswirkungen auf die Insertionsreaktion hat. Im Gel ist zu sehen, daß bei dieser Kontrollinsertion der radioaktive Hintergrund im Gel verstärkt wurde, das jedoch die Insertionsrate des Proteins nur wenig beeinträchtigt war (Spuren 1 und 2). Der N-proximal markierte (His)₆-Klon D7PH11 aggregierte dagegen mit 5 mM L-Histidin im Insertionsansatz stark (Spur 6). Im Fluorogramm traten keine Signale auf, die charakteristisch für stabil inseriertes Protein wären. Diese Beobachtung führt zu der Vermutung, daß nach der Zugabe von freiem L-Histidin noch Kreuzverknüpfungen zwischen Protein-gebundenen Histidin-Resten möglich sind.

Daß es sich bei den Signalen des Klon D7PH11 (unverdautes Protein, sowie Abbauprodukte um 27-, 23- und 20 kDa) nicht um stabil inseriertes Protein handeln kann, konnte mit weiteren Versuchsvarianten gezeigt werden: In einem Ansatz wurde die Insertion ohne Zugabe von Stromaextrakt durchgeführt (Spur 3 und 7). Stromaextrakt enthält Faktoren die zur Lhcb1-Insertion notwendig sind (Cline, 1986; Payan und Cline, 1991; Li *et al.*, 1995; Schuenemann *et al.*, 1998; Kogata *et al.*, 1999). Lhcb1 kann ohne Stromaextrakt nicht in isolierte Thylakoide eingebaut werden. Auch NTPs sind für den stabilen Einbau von Lhcb1 essentiell (Hoffman und Franklin, 1994; Cline 1988; Cline, 1986). In einem weiteren Ansatz wurden deshalb keine Nukleosidtriphosphate (NTPs) zugegeben (Spuren 4 und 8), das ATP-hydrolysierende Enzym Apyrase wurde ebenfalls zugegeben, um Plastiden-eigenes ATP zu hydrolysieren. Einem dritten Kontrollansatz (Spuren 9 und 10) fehlten die Thylakoidmembranen. Die Proben nach der Reaktion kurz zentrifugiert und das Pellet wurde mit Thermolysin behandelt.

Im Gegensatz zur Insertion unter Standardbedingungen, bildete D7PH11 ohne Stroma- bzw. Thylakoid-Zugabe kein DP*. Dagegen traten nur unverdautes Protein und die bereits erwähnten Abbauprodukte auf (Spuren 7 und 9; vgl. auch Insertion mit Ni^{2+} , Abbildung 3.4-4). Diese Produkte traten ebenfalls, wenn auch mit etwas schwächeren Signalintensitäten, bei der Negativkontrolle ohne ATP auf (Spur 8). Mit den gleichen experimentellen Ansätzen konnten bei Wildtyp-pLhcb1 ebenfalls keine Insertionsprodukte mehr detektiert werden. Im Ansatz ohne Thylakoide (Spur 10) ist bei pLhcb1 eine Spur von unverdaulichem Volllängenprotein zu erkennen. Es ist anzumerken, daß die etwas unterschiedliche Verteilung der PA-Banden wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß die Auftrennung der Probe in einem anderen Gel erfolgt war. Auch bei den anderen Hexahistidyl-verlängerten Klonen tauchte das Bandenmuster zuweilen auf (unverdautes Protein und Doppelbanden bei etwa 23 und 20 kDa). Da zumindest der Negativansatz ohne ATP/ mit Apyrase (ATP-Hydrolyse, siehe oben) eine Insertion eindeutig verhindern konnte, muß davon ausgegangen werden, daß, wann immer dieses Bandenmuster in einem Gel auftrat, die Signale nicht von stabil inseriertem Protein stammen konnten.

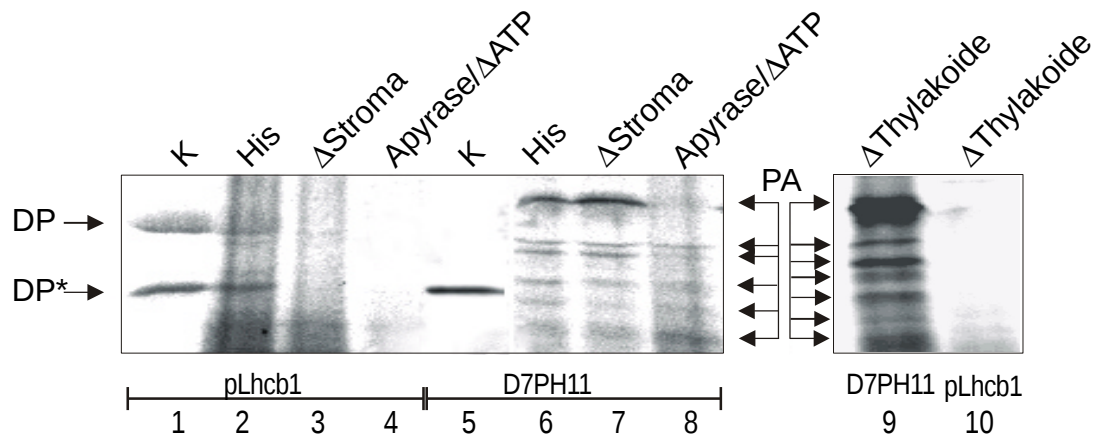


Abbildung 3.4-2 Charakterisierung stabil inserierter Histidin-markierter Proteine. Pro Insertionsansatz wurden 1×10^7 cpm radioaktiv markiertes Protein eingesetzt (entspricht 300 ng). K: Standard-Insertionsansatz mit 1,2 mg Stromaprotein (Kontrolle); His: Standard-Insertionsansatz mit 1,2 mg Stromaprotein und 5 mM Histidin; Δ Stroma: Insertion ohne Stromaproteine; Apyrase/ Δ ATP: Insertionsansatz + 2U Apyrase ohne ATP-Zugabe im Dunkeln; Δ Thylakoide: Insertionsansatz ohne Thylakoidmembranen. Die Proteine von 1/4 Insertionsansatz (Spuren 1-8, 8,5 μ g Chlorophyll) wurden nach der Thermolysin-Behandlung der Thylakoidmembranen gefällt, in einem denaturierenden Gel aufgetrennt und fluorographisch dokumentiert. Die Δ Thylakoid-Proben (Spuren 9-10) wurden zentrifugiert, erneut in 10-0,5HC (Material und Methoden 2.5.2.1) aufgenommen und ebenfalls Thermolysin-behandelt. Hier wurde je 1/4 Insertionsansatz auf das Gel aufgetragen. Expositionsdauer: 4d; DP* = Degradationsprodukt monomerer Komplexe; DP = Degradationsprodukt trimerer Komplexe; PA = Proteinaggregate, die der Thermolysin-Behandlung nicht oder nur bedingt zugänglich sind. Es handelt sich hierbei nicht um stabil inseriertes Protein.

Um die Löslichkeit markierter Proteine zu verbessern, wurde Detergens im Insertionsansatz zugegeben. Ob dies zu einer Steigerung der Insertionseffizienz führen könnte, sollte mit der Analyse der Insertions-Produkte erfolgen (Abbildung 3.4-3). Verwendet wurde das nicht ionische Detergens Octylglycosid (OG).

Auf dem Gel war folgendes zu erkennen: Lhcb1 bildete nach Thermolysin-Verdau in beiden Versuchsansätzen die stabilen Einbauprodukte DP und DP*. Die Signalstärke der mit 0,02 % OG inserierten Wildtyp-Proteine war jedoch wesentlich schwächer. Der Histidin-markierte Klon D7PH11, mit "His-Tag" N-proximal der ersten Transmembran-Helix, trimerisierte nie (vgl. auch Abbildung 3.4-1). Im denaturierenden Gel trat daher nur das DP* und die bereits erwähnte, etwas langsamer wandernde Aggregatbande auf (Abbildung 3.4-1). Mit 0,02 % OG im Insertionsansatz hatte bei D7PH11 sowohl der radioaktive Hintergrund im Gel als auch die Stärke des Aggregatsignals zugenommen. Octylglycosid hemmte also die Insertion an sich.

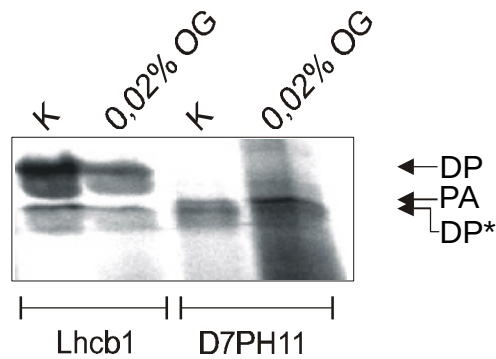


Abbildung 3.4-3 Die Insertion wird durch das Detergens Octylglycosid (OG) gehemmt. Je

Klon wurden 250 ng (4×10^5 cpm, Lhcb1; bzw. 5×10^5 D7PH11) radioaktiv markiertes Protein in einer Standardinsertion inseriert (K), bzw. wurde die Proteinlösung (8M Urea) zusätzlich mit 1% OG versetzt (Endkonzentration im Insertionsansatz = 0,02 %). Pro Insertion wurden 0,9 mg Stromaprotein eingesetzt. Die Proteine von 1/3 Insertionsansatz (11,3 µg Chlorophyll) wurden nach der Thermolysin-Behandlung der Thylakoide gefällt, in einem denaturierenden Gel aufgetrennt und fluorographisch dokumentiert. Expositionsdauer: 6 d; DP* = Degradationsprodukt monomerer Komplexe; DP = Degradationsprodukt trimerer Komplexe; K = Kontrollansatz; PA = Proteinaggregate, die der Thermolysin-Behandlung nicht oder nur bedingt zugänglich sind. Es handelt sich hierbei nicht um stabil inseriertes Protein.

Metallionen, wie Ni^{2+} , Cu^{2+} und Zn^{2+} haben im leicht basischen Milieu eine hohe Affinität zu Histidin-Resten, besonders, wenn sie in einem Peptid in direkter Nachbarschaft vorliegen. Allgemein gilt für die Bindeaffinität der Übergangsmetalle die Irving-Williams-Reihe: $\text{Mn} < \text{Fe} < \text{Co} < \text{Ni} < \text{Cu} > \text{Zn}$. Die absolute (vom pH-Wert unabhängige) Bindekonstante von Ni^{2+} /Histidin mit $\text{M} = \text{Metall}$; $\text{L} = \text{Ligand}$ und der Reaktion



Für die Reaktion des Metalls mit mehr zwei Liganden $\text{ML} + \text{L} \rightleftharpoons \text{ML}_2$ gilt:

$$\beta_2 = 3,3 \times 10^{15} \text{ M}^{-1} \text{ und } K_2 = [\text{ML}_2] / [\text{ML}][\text{L}] \text{ und } \beta_2 = K_1 K_2$$

(Dawson, Data for Biochemical Research, 1986)

Die Bindekonstante für Ni^{2+} mit His_6 liegt bei $1 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$. Das molare Verhältnis von Metallion zu Protein im Ansatz betrug bei 250 µg eingesetztem Lhcb1 (0,1 µM) und 10 µM Ni^{2+} ca. 100:1.

Mit dem in Abbildung 3.4-4 gezeigten Versuch sollte untersucht werden, ob die Insertion Histidin-markierter Proteine in die Thylakoidmembran durch eine Zugabe von bis zu 1 mM Ni^{2+} gestört werden kann. Zur Kontrolle wurde nicht Histidin-markiertes, matures Lhcb1 unter den gleichen Bedingungen inseriert.

Wie auf der Abbildung zu erkennen ist, beeinträchtigte die Zugabe der Nickelionen die Einbau-effizienz des maturen Wildtyp-Proteins nur geringfügig. Eine leichte Abnahme von 0 bis 1000 µM Ni^{2+} war erkennbar. Völlig unverdautes Protein, oder weitere Proteinfragmente wurden nicht gefunden. Bei dem N-terminal markierten pLhcb1-Klon 44C.3 war die Abnahme in der Insertionseffizienz bei 1000 µM Ni^{2+} im Vergleich zum Wildtyp-Protein (Lhcb1) etwas deutlicher. Der N-proximal markierte Klon D7PH11, welcher nie trimerisierte, zeigte eine stetige Abnahme des monomeren Degradationsprodukts DP* mit steigender Nickelkonzentration. DP* war noch bis 100 µM Ni^{2+} eindeutig nachweisbar. Die Signale

unverdauten bzw. aggregierten Proteins verstärkten sich ab 100 μM Ni^{2+} im Insertionsansatz. Bei 1000 μM Ni^{2+} war DP* nicht mehr eindeutig identifizierbar. Klon D7AH2, der sich im allgemeinen etwas schlechter inserieren ließ, bildete hier monomere Komplexe bis 1000 μM Ni^{2+} im Insertionsansatz (DP*). Das Signal, das von völlig unverdaulichem Protein stammen mußte, verstärkte sich zunächst ab 10 μM Nickel²⁺. Mit 1000 μM Ni^{2+} nahm die Signalintensität des unverdaulichen Proteins wieder ab. Weiterhin war mit 1000 μM Ni^{2+} eine generelle Abnahme in der Signalintensität feststellbar. Das Verhältnis von monomeren Komplexen zu unverdaulichen Aggregaten nahm von 0-1000 μM Ni^{2+} stetig ab. Der C-terminal His₆-markierte Klon C3.2h reagierte am stärksten auf die Nickelzugabe. Das schwache Insertionssignal DP, das bei der Kontrollinsertion noch gerade zu erkennen war, fehlte schon bei 10 μM Ni^{2+} im Ansatz. DP* war ebenfalls ab 10 μM Ni^{2+} nicht mehr identifizierbar, da bereits hier das typische Bandenmuster auftrat, das nicht stabil inserierte His₆-Klone charakterisierte.

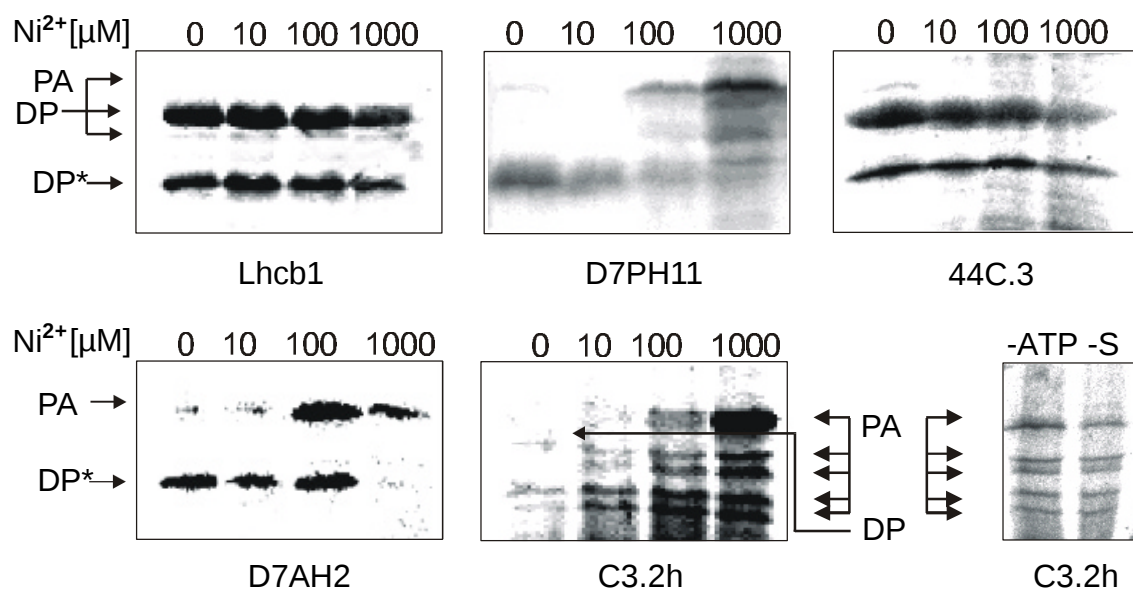


Abbildung 3.4-4 Der Einfluß von Nickelionen auf die Insertion Histidin-markierter

Proteine. Es wurden 5×10^5 cpm radioaktiv markiertes Protein und 1 mg Stromaprotein pro Insertionsansatz eingesetzt. Dem Insertionspuffer wurde NiCl_2 zugegeben, so daß sich folgende Ni^{2+} -Endkonzentrationen in den Insertionsansätzen ergaben: Spur 1: Kontrolle (0 μM Ni^{2+}); Spur 2: 10 μM Ni^{2+} ; Spur 3: 100 μM Ni^{2+} ; Spur 4: 1000 μM Ni^{2+} . Die Proteine von 1/3 Insertionsansatz (11,3 μg Chlorophyll) wurden nach der Thermolysin-Behandlung der Thylakoidmembranen gefällt, in einem denaturierenden Gel aufgetrennt und fluorographisch dokumentiert. Expositionsdauer: D7AH2: 3d; Lhcb1: 4d; C3.2h: 5d; D7PH11 und 44C.3: 6d; Lhcb1 wurde auf einem hochprozentigen Gel aufgetrennt; daher ist die Laufweite von DP und DP* nicht mit der Laufweite der anderen Klone vergleichbar. (16,5% T, 6% C ; Kapitel 2.2.3); -ATP: Insertionsansatz + 2U Apyrase ohne ATP-Zugabe im Dunkeln. ATP: Insertionsansatz + 2U Apyrase ohne ATP-Zugabe im Dunkeln. DP* = Degradationsprodukt monomerer Komplexe; DP = Degradationsprodukt trimerer Komplexe; PA = Proteinaggregate, die der Thermolysin-Behandlung nicht oder nur bedingt zugänglich sind. Es handelt sich hierbei nicht um stabil inseriertes Protein.

Die Insertion des C-terminal markierten Klons wurde durch Ni^{2+} am stärksten gestört. Beeinträchtigt wurden auch die Klone D7AH2 und D7PH11, deren His_6 -Positionen auf der stromalen Seite des inserierten Komplexes liegen. Zu D7AH2 ist anzumerken, daß der Komplex sich bereits in den *in vitro* Experimenten (Kapitel 3.2) als relativ instabil erwiesen hatte, was sich auch auf die Insertionseffizienz auswirken könnte. Am wenigsten wurde die Insertion bei Lhcb1-Derivaten gestört, die entweder keine Histidin-Verlängerung trugen (Lhcb1) oder am äußeren N-Terminus markiert waren.

Wenn die Insertion Histidin-markierter Proteine durch die Komplexbildung mit Nickelionen hemmbar ist (Abbildung 3.4-4), so sollte die Zugabe eines Ni^{2+} -bindenden Agens, wie EDTA, einen antagonistischen Effekt zeigen und die Hemmung der Insertion zumindest teilweise wieder aufheben können. Wie in Abbildung 3.4-4 bereits gezeigt, hemmte 1 mM Ni^{2+} die Insertion des Wildtyp Proteins Lhcb1 (D7f.3) nur wenig, wogegen die beiden hier eingesetzten Histidin-Klone mit 1 mM Nickelionen nicht mehr inseriert werden konnten.

Die Bindekonstante für EDTA/ Ni^{2+} liegt bei $3,6 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}$, also höher als für freies L-Histidin ($4,6 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$). Freies L-Histidin alleine hatte schon eine Insertions-hemmende Wirkung (Abbildung 3.4-2). In diesem Fall sollte daher EDTA als alternativer Komplexbildner untersucht werden.

Die Zugabe von 0,2 mM EDTA zum Insertionsansatz bewirkte keine Aufhebung des hemmenden Effekts von Ni^{2+} . In keinem Fall konnten stabil inserierte Proteine detektiert werden. Allerdings hatte, wie auch L-Histidin, schon EDTA alleine eine hemmende Wirkung auf die Insertion aller Proteine. In beiden Abbildungen ist zu erkennen, daß sowohl das Lhcb1, als auch die beiden Histidin-markierten Klone mit EDTA im Ansatz nicht mehr in die Thylakoide inseriert werden konnten. Während Wildtyp Lhcb1 mit Ni^{2+} alleine noch stabil eingebaut werden konnte, wurde es mit Ni^{2+} und gleichzeitiger EDTA-Zugabe nicht mehr inseriert. Die Markierung von Proteinbanden mit dem Symbol # zeigt aggregiertes Protein. Ein Vergleich der Insertionen, die unter "ungünstigen" Bedingungen durchgeführt wurden, deutete darauf hin, daß es sich bei den mit # gekennzeichneten Banden tatsächlich um aggregiertes, unverdautes bzw. teilweise verdautes Protein handelte (vgl. z.B. Abbildung 3.4-2 und 3.4-4).

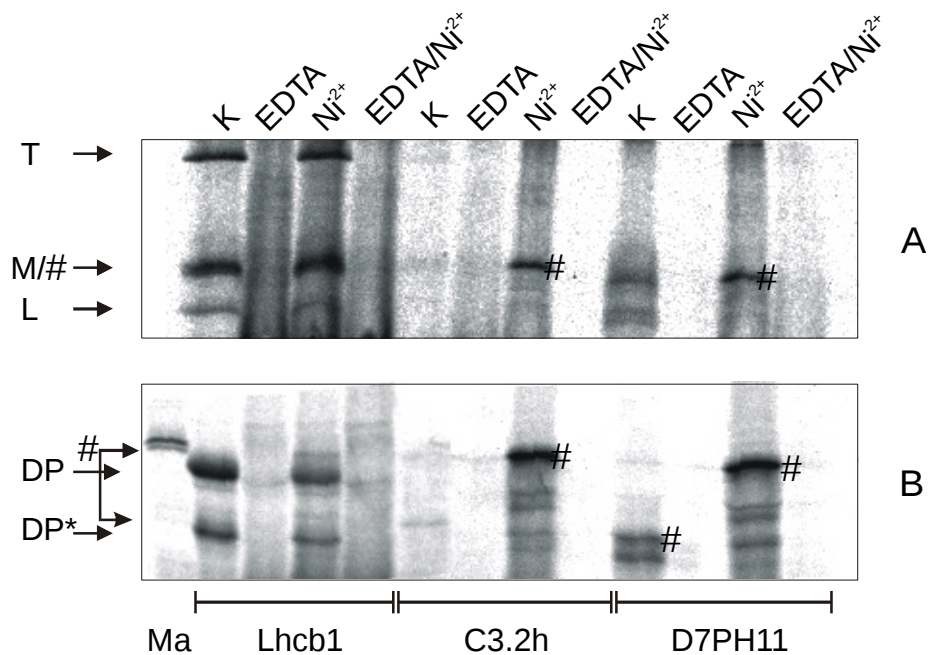


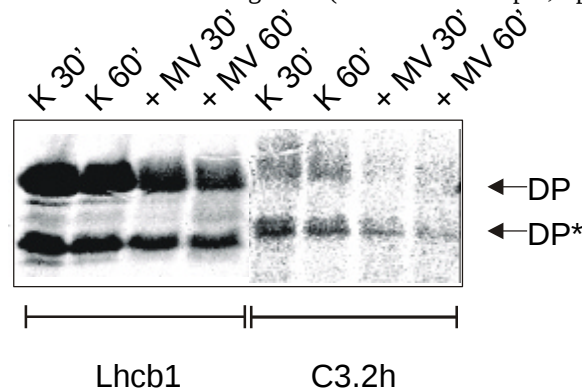
Abbildung 3.4-5 EDTA hemmt die Insertion von Lhcb1 in Thylakoide. Je Klon wurden 5×10^5 cpm radioaktiv markiertes Protein und 1 mg Stromaprotein für eine Insertion eingesetzt. Als Kontrolle (K) dienen Insertionsansätze, die unter Standardbedingungen durchgeführt wurden. EDTA = Zugabe von 10 mM EDTA zur Proteinlösung (in 8M Urea; Endkonzentration im Ansatz 0,2 mM) Ni^{2+} = Zugabe von 1 mM Ni^{2+} zum Insertionsansatz. A: Membranen von 1/4 Insertionsansatz (8,5 μg Chlorophyll) wurden nach der Thermolysin-Behandlung der Thylakoide auf ein schwach denaturierendes Gel aufgetragen und fluorographisch dokumentiert. B: Die Proteine von 1/4 Insertionsansatz (8,5 μg Chlorophyll) wurden nach der Thermolysin-Behandlung der Thylakoide gefällt, in einem denaturierenden Gel aufgetragen und fluorographisch dokumentiert. Expositionsdauer: 4 d; L = freies, unkomplexiertes Protein; M = monomere Komplexe; T = trimere Komplexe; DP* = Degradationsprodukt monomerer Komplexe; DP = Degradationsprodukt trimerer Komplexe, Ma = Marker-Protein 27- und 25 kDa; # = Proteinaggregate.

Klon C3.2 h (Hexahistidyl-Verlängerung am C-Terminus) inserierte im Vergleich zu unmarkiertem, bzw. Stroma-seitig markiertem Protein wesentlich schlechter (siehe Abbildung 3.4-1, 3.4-4 und 3.4-5). Um zu überprüfen, ob eine Verlängerung der Insertions-Inkubationszeit die Menge an inseriertem Protein erhöhen könnte, wurde die Dauer der Reaktion von 30 Min auf 60 Min erhöht (Abbildung 3.4-6). Da eine Standardinsertion nur unter Belichtung stattfand, mußte davon ausgegangen werden, daß Elektronen transportiert werden. Da in diesem isolierten System Elektronen nicht abtransportierbar sind, könnten Konsequenzen für den Proteintransport entstehen, d.h. das System könnte an einer ganz anderen Stelle zusammenbrechen. Mit dem Versuch, das Insertionssystem dahingehend etwas zu stabilisieren, wurde in einem weiteren Ansatz das Dipyridyliumsalz Methylviologen als Elektronenakzeptor von PhotosystemI (PSI) eingesetzt.

Lhcb1 (Spuren 1-4) zeigte nach 60 Min keine weitere Steigerung der Signalintensität. Die Signalstärke schien vielmehr nach 60 Min, zumindest bei der DP*-Bande, wieder etwas geringer zu werden. Mit 100 μM Methylviologen im Insertionsansatz wurde die Insertionseffizienz stark herabgesetzt. Auch hier lies die Signalintensität nach 60 Min nach. Die unter den gleichen Bedingungen durchgeführten Versuchsansätze mit Klon C3.2h (Spuren 5-8) lieferten ähnliche Ergebnisse, mit der Einschränkung, daß dieser Klon von vornherein weniger gut in die Membran inseriert. Weder die Verlängerung der Insertionsdauer, noch die

Verwendung des künstlichen Elektronenakzeptors Methylviologen konnte also den Einbau von Lhcb1 in die Thylakoide begünstigen.

Abbildung 3.4-6 Der Einfluß eines Elektronenakzeptors auf die Insertion. Pro Insertionsansatz wurden 250 ng radioaktiv markiertes Protein eingesetzt (Lhcb1: 4×10^5 cpm; Spur 1-4; C3.2h: $2,1 \times 10^5$ cpm; Spur



5-8). K: Standard-Insertionsansatz mit 1,2 mg Stromaprotein (Kontrolle; Spur: 1,2,5,6); MV: Insertionsansatz mit 1,2 mg Stromaprotein und 100 μ M Methylviologen (MV; Bahnen 3,4,7,8). Die Insertionszeit betrug 30 Min (Standardbedingungen), Spur 1,3,5,7; bzw. 60 Min, Spur 2,4,6,8. Die Proteine von 1/3 Insertionsansatz (11,3 μ g Chlorophyll) wurden nach der Thermolysin-Behandlung der Thylakoidmembranen gefällt, in einem denaturierenden Gel aufgetrennt und fluorographisch dokumentiert. Expositionsdauer: 14 d; DP* = Degradationsprodukt monomerer Komplexe; DP = Degradationsprodukt trimerer Komplexe

Insertionsexperimente mit dem Precursor-Lhcb1 konnten beweisen, daß das Protein mitsamt der Signalsequenz in die Thylakoide inserierte (Cline 1986, Cline *et al.*, 1989, Yuan *et al.*, 1993). Ein Teil des Proteins wurde jedoch schon während der Insertion von der Stroma-Peptidase (SPP, Richter und Lamppa, 1998) maturiert. Das Nachweiskriterium stabil inserierter Proteine ist mit einem proteolytischen Abbau (Thermolysin) am N-Terminus von LHCII bis mindestens zur Aminosäure Lys⁸ (DP) bzw. Gly⁵⁰ (DP*) verbunden. Daher kann nach einer Protease-Behandlung nicht mehr beurteilt werden, ob DP und DP* ursprünglich aus dem Einbau des prozessierten oder des nicht prozessierten Proteins hervorgegangen sind. Ein weiterer Nachweis für einen stabilen Einbau von Lhcb1 ist das Auftreten von Trimeren im schwach denaturierenden Gel. Wenn es möglich ist, N-terminal veränderte Lhcb1-Derivate aufgrund von Migrationsunterschieden ihrer Trimere im Gel voneinander zu trennen, wäre dies der Beweis dafür, daß die Proteine nicht bereits vor dem Einbau in die Thylakoide zu maturem Protein prozessiert worden sind. Damit ließe sich klären, ob die vergleichbar hohe Insertionskompetenz des Klons 44C.3, einem Lhcb1-Precursorprotein mit einem "His-Tag" am N-Terminus, eine Folge der Proteolyse des Signalpeptids ist, oder ob die Position der Markierung (N-Terminus) die Insertion per se nicht stört.

Die Klone D7f.3 (Lhcb1), 42g.1 (pLhcb1) und 44C.3 wurden inseriert und nebeneinander in einem nicht denaturierenden und einem denaturierenden Gel aufgetrennt (Abbildung 3.4-7). Fluorogramm A zeigt die unverdauten Insertionsprodukte nach schwach denaturierender Gelelektrophorese. Die Trimere der unterschiedlichen Klone weisen einen schwachen Migrationsunterschied auf. Am schnellsten wandern die Trimere von Lhcb1, am langsamsten die des Klons 44C.3. Der Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit der Trimere deutet darauf hin, daß das Signalpeptid der beiden pLhcb1-Klone auch nach der Insertion in die Thylakoide noch erhalten geblieben ist. Bis auf den N-Terminus unterscheiden sich die Proteine ansonsten nicht voneinander.

In Fluorogramm A tauchen neben den inserierten Proteinen auch nicht inserierte Proteine auf. Freie Lhcb1 Monomere (M) wanderten mit den freien Apoproteinen (L). Bei beiden pLhcb1-Klonen wanderte freies Apoprotein langsamer als die Monomere (siehe auch Abbildung 3.2-1). Bei pLhcb1 tritt im Gel eine dritte Proteinbande auf, bei 44C.3 sind mindestens zwei weitere Banden neben dem freien Protein zu erkennen. Dies ist ein Hinweis darauf, daß zumindest ein Teil des Proteins bereits vor der Insertion maturiert wurde. Eine Zuordnung der einzelnen Banden zu Monomeren, freiem Apoprotein und verkürzten Monomeren bzw. verkürztem freiem Apoprotein ist daher nicht möglich. Der Vergleich der Insertionsprodukte erfolgt daher lediglich auf Trimer-Ebene. Trimer-Banden stellen in jedem Fall komplexiertes Protein dar.

In Fluorogramm B, das die Thermolysin-verdauten Insertionsansätze zeigt, kann kein Unterschied in der Laufweite der verdauten Trimere festgestellt werden. Die Proteine wurden durch den Thermolysin-Verdau auf die gleiche Länge verkürzt. Fluorogramm C zeigt die aufgetrennten Apoproteine DP und DP* nach Protease-Verdau. Ein Vergleich der Signalintensitäten in diesem Fluorogramm erlaubt eine Beurteilung der relativen Insertionseffizienz dieser Proteine. Die Signalintensitäten nehmen in folgender Reihenfolge ab: Lhcb1 > pLhcb1 > 44C.3, obwohl die gleiche Menge ^{35}S -markiertes Protein eingesetzt wurde (vgl. auch Signalstärke des Fluorogramms A, daß die Gesamtaktivität aufweist). Das Trimer:Monomer-Verhältnis der einzelnen Klone hat sich nicht verändert (ca. 3:1).

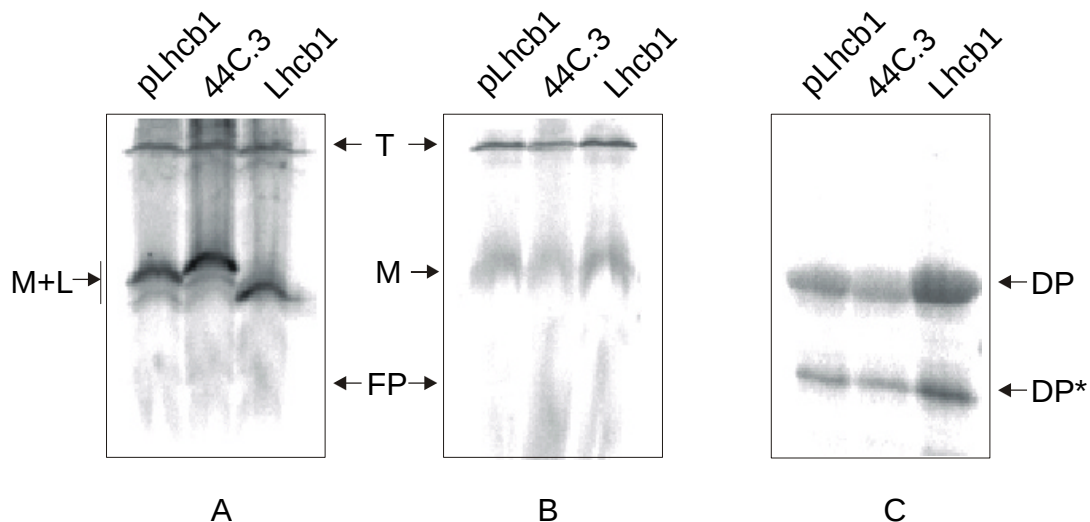


Abbildung 3.4-7 Insertion von maturem und Precursor-Lhcb1. Je Klon wurden 5×10^5 cpm radioaktiv markiertes Protein in einem Standard-Insertionsansatz inseriert. Pro Insertion wurden 1,26 mg Stromaprotein eingesetzt. A: Membranen von 1/5 Insertionsansatz (6,8 μ g Chlorophyll) wurden nach der Insertion in einem schwach denaturierenden Gel aufgetrennt und fluorographisch dokumentiert. B: Membranen von 1/5 Insertionsansatz (6,8 μ g Chlorophyll) wurden nach der Thermolysin-Behandlung der Thylakoide auf ein schwach denaturierendes Gel aufgetragen und fluorographisch dokumentiert. C: Die Proteine von 1/3 Insertionsansatz (11,3 μ g Chlorophyll) wurden nach der Thermolysin-Behandlung der Thylakoide gefällt, in einem denaturierenden Gel aufgetragen und fluorographisch dokumentiert. Expositionsdauer: 7 d; FP = freies Pigment; L = freies, unkomplexiertes Protein; M = monomere Komplexe; T = trimere Komplexe; DP* = Degradationsprodukt monomerer Komplexe; DP = Degradationsprodukt trimerer Komplexe.

3.5 Insertion von Lhca1 in isolierte Erbsenthylakoide

Mit Hilfe rekombinanter Lhcb1 Apoproteine werden Untersuchungen zu Struktur-Funktions-Beziehungen der PSII-Antenne (LHCII) durchgeführt. Dazu dienen *in vitro* Rekonstitutions- und Trimerisierungsexperimente. Zur Untersuchung der LHCII-Biogenese eignet sich das Insertionssystem für rekombinantes Lhcb1 aus Erbse mit isolierten Erbsenthylakoiden (Yuan *et al.* 1993, Kuttkat *et al.*, 1995). Mit diesem System können ebenfalls Untersuchungen zu Struktur-Funktions-Beziehungen durchgeführt, bzw. Ergebnisse aus *in vitro* Faltungsexperimenten unterstützt werden (z.B. Analyse der Lhcb1-Derivate aus Kapitel 3.6, Abbildung 3.6-1). Daneben gibt es analoge Untersuchungen zur Lichtsammel-Antenne (LHCI) von PSI. LHCI liegt in der Pflanze als dimerer Komplex vor. Man unterscheidet die Sub-Komplexe: LHCI-730, ein Heterodimer aus den Apoproteinen Lhca1 und Lhca4 und LHCI-680, ein Homodimer, das entweder aus Lhca2 oder Lhca3 besteht (Jansson *et al.*, 1996, Schmid *et al.*, 1997).

Bisher wurden mit einem *in vitro* Insertionssystem keine Untersuchungen zur LHCI-Biogenese durchgeführt. Aufgrund der engen Verwandtschaft der Lichtsammelproteine ist es sehr wahrscheinlich, daß die Biogenese der PSI-Antennen (Lhca) zumindest in den frühen Schritten mit Hilfe der gleichen Translokationsapparat abläuft (cpSRP-abhängiger Transport), über den auch die majoren PSII Antennen (Lhcb1,2) transportiert werden. Falls dies zutrifft, sollte es möglich sein, überexprimiertes, [³⁵S]Methionin-markiertes Lhca1 aus Tomate unter Standard-Insertionsbedingungen in isolierte Erbsenthylakoide zu inserieren und Protease-resistente Insertionsprodukte nachzuweisen. Es stellte sich dabei die Frage, ob die Insertion eines der beiden Proteine (Lhca1 oder Lhca4) alleine ausreicht, um eine Assemblierung dimerer Komplexe zu erreichen.

Für die Lichtsammelproteine des PSII konnte bereits gezeigt werden, daß stabil inserierte Trimere und Monomere unterschiedlich sensitiv gegenüber Thermolysin sind (Kuttkat *et al.*, 1995, sowie Kapitel 3.4) Ein solcher Nachweis wäre auch für Experimente zum Einbau von Lichtsammelproteinen des PSI nützlich. Da über die Protease-Empfindlichkeit dieser Proteine bisher nichts bekannt war, wurden in einem Vorversuch isolierte Erbsenthylakoide mit den Proteasen Trypsin bzw. Thermolysin behandelt und auf einem denaturierenden Gel aufgetrennt. Ein Gel wurde mit Coomassie Blau angefärbt, ein zweites Gel wurde auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und die Lhca-Proteine mit Hilfe eines LHCI-Antikörpers nachgewiesen (Abbildung 3.5-1).

Die in Thylakoiden dominierenden Lhcb-Apoproteine wurden in den unverdauten Kontrollproben (K) des Coomassie-gefärbten Gels deutlich angefärbt (Abbildung 3.5-1, Gel A). Die Kontrollansätze wurden jeweils unter den gleichen Bedingungen (Temperatur/Dauer) inkubiert, wie die entsprechenden Verdaue, mit der Ausnahme, daß die Kontrollen keine Protease enthielten. Bereits nach 30 Min war das Vollängen-Lhcb1,2 in allen Verdauensätzen abgebaut. In den Gelspuren traten entsprechend kürzere Proteinfragmente auf. Im Coomassie-gefärbten Gel, das alle im Thylakoiden vorkommende Proteine färbt, konnten die Fragmente allerdings nicht eindeutig zugeordnet werden. Daher sollte mittels Western-Blot und anschließender Antikörper-Reaktion LHCI spezifisch nachgewiesen werden. Hier muß allerdings angemerkt werden, daß die verwendeten LHCI-730-Antikörper (gegen Lhca1 und Lhca4 gerichtet) auch mit den Apoproteinen des LHCII kreuzreagieren. Daher wurden auf der Membran auch unverdautes Lhcb1, sowie DP gefärbt. Lhcb1-DP* konnte nicht nachgewiesen werden, da dieses Produkt mit etwa 20 kDa genau mit Lhca1 wandern würde. In den Thylakoiden assembliertes LHCI schien vollkommen Protease-resistent zu sein. Es wurden keine Abbaufragmente, oder eine Abnahme in der Signalintensität der Proteinbanden detektiert. Schließlich ist anzumerken, daß obwohl die Thylakoide jeder Probe die gleichen Mengen an Chlorophyll aufweisen sollten, ein Unterschied in der Coomassie-Färbung auftrat: Auf dem Gel wiesen die ersten vier Spuren (Trp und deren Kontrollen) im hochmolekularen Bereich eine einzelne stärker gefärbte Bande auf, während an dieser Position bei den letzten fünf Proben (TL und deren Kontrollen) eine schwächer gefärbte Doppelbande auftrat. Die Ursache könnte in den Thylakoid-Präparationen gelegen haben. Der Trypsin-Verdau (und Kontrollen) fand in frisch isolierten Thylakoiden statt, wogegen eingefrorene und gewaschene Thylakoide für den

Thermolysinverdau verwendet wurden. Entweder wurde durch das Auftauen und Abzentrifugieren der Thylakoide die Proteinzusammensetzung verändert (Löslichkeit), oder die Zugabe von Kalziumionen war die Ursache für das differentielle Bandenmuster im Molekulargewichtsbereich um 50 kDa (Assoziationsunterschiede der Proteine). Dies hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Protease-Sensitivität von Lhcb1,2 und Lhca1 bzw. Lhca4.

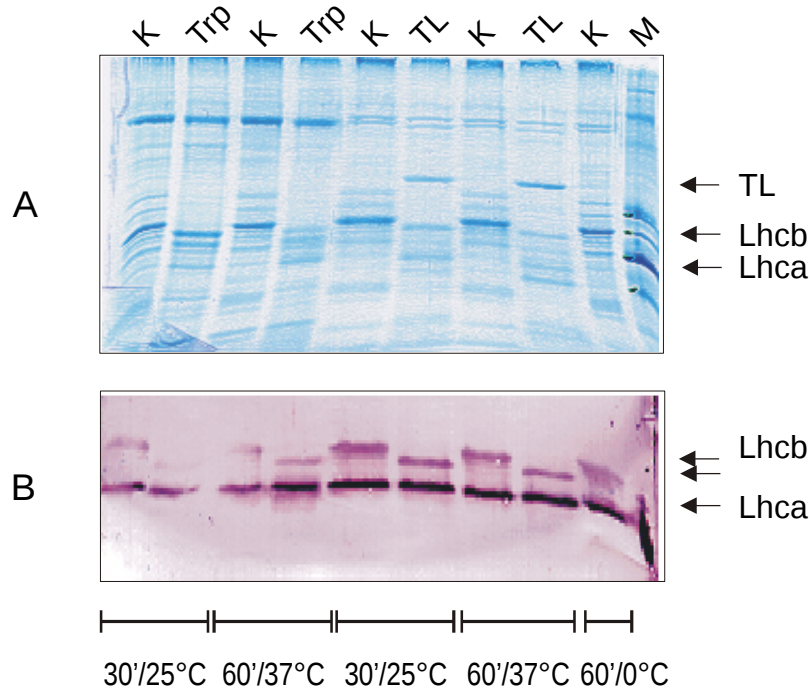


Abbildung 3.5-1 Differentielle Protease-Sensitivität von LHCI und LHCII. Isolierte Erbsenthylakoide (12 µg Chlorophyll) wurden in 0,03% Dodecylmaltosid (LM); 7,5 mM Tricine, pH 7,8; 0,14 mM EDTA und 14 % Glycerin aufgenommen. Die Proben (Spuren Trp bzw. TL) wurden mit 0,1 mg/ml Protease-Lösung versetzt. Den Thermolysin-Proben wurde zusätzlich 0,5 mM Ca^{2+} zugegeben. Die Proben (TL, Trp und K) wurden für 30 Min bei 25 °C oder 60 Min bei 37 °C inkubiert. Eine weitere Probe (K, vorletzte Spur, ebenfalls mit Ca^{2+}) wurde 60 Min auf Eis aufbewahrt. Die Protease-Verdaue der Trypsin-versetzten Proben wurden mit 10 mM Phenylmethansulfonsäurefluorid (PMSF), Thermolysinproben mit 25 mM EDTA abgestoppt. Die Proben wurden mit Sparmix versetzt, 3 Min gekocht und je 15 µl (1,2 µg Chlorophyll) wurden in einem 15%-igem denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Ein Gel wurde mit Coomassie angefärbt (A). Ein entsprechendes zweites Gel wurde auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (B). Die Antikörper-Inkubation mit Anti-LHCI-730 (Lhca1 und Lhca4) fand mit einer Verdünnung von 1:750, 1h in 1/2 Blocking-Lösung statt. Der sekundäre Antikörper, Anti-Rabbit-Alkalische Phosphatase Konjugat wurde mit einer Verdünnung von 1:2000, 1h in TBS-TTinkubiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit BCIP/NBT (siehe auch Kapitel 2.2.6.3). Thermolysin = TL, Trypsin = Trp, K = Kontrollprobe ohne Protease, Lhcb = Lichtsammelprotein des Photosystems II, Lhca = Lichtsammelprotein des Photosystems I, DP = Degradationsprodukt. M = Marker (3 µl Serva-Marker 4+5, sowie je 0,5 µg D7f.3 (Lhcb1, ca. 25 kDa) und cab 6 (Lhca1, ca. 22 kDa)).

Die Fluorogramme A und B der Abbildung 3.5-2 zeigen die radioaktiven Signale einer Lhcb1 und Lhca1-Insertion nach Thermolysin-Verdau. Gel A zeigt die Trennung von Pigment-Protein Komplexen unter schwach denaturierenden Bedingungen. Die jeweils rechte Spur (Lhcb1-ATP/Lhca1-ATP) zeigt ein Insertionsexperiment, bei dem die Insertion des Proteins durch die Zugabe von Apyrase und das Fehlen von ATP verhindert wurde (vgl. auch Abbildung 3.4-2 und 3.4-4). Hier traten weder bei Lhcb1, noch bei Lhca1 stabil inserierte Produkte auf. Dagegen wanderte nach der Lhcb1 Standardinsertion (Lhcb1) das radioaktive Signal wie erwartet mit trimerem und monomerem LHCI, bzw. im denaturierenden Gel mit den entsprechenden Degradationsprodukten DP und DP*. Die radioaktiven Signale der Lhca1-Proteine (Lhca1) ergaben folgendes Laufverhalten: Die inserierten Proteine wanderten mit LHCI-Monomeren, LHCI-Dimeren und mit PSI. Ein weiteres radioaktives Signal, oberhalb der LHCI-Dimere war zu beobachten. Dieses Signal könnte von PSI-Abbauprodukten stammen. Die Zuordnung der einzelnen Banden zu den Komplexen, erfolgte durch einen Vergleich der schwach denaturierenden Gele mit solchen aus der Literatur (Peter und Thornber, 1991; Schmid und Schäfer, 1994).

Während der Thermolysin-Verdau bei Lhcb1-Proteinen zu einer differentiellen Degradation von Monomeren und Trimeren führte, trat bei Lhca1 im denaturierenden Gel ein einziges Signal mit etwa 22 kDa auf. Dies entspricht dem Molekulargewicht des überexprimierten Lhca1. Das heißt, daß sowohl natives LHCI aus der Erbse, als auch in Erbsenthylakoide inseriertes Tomaten Lhca1 durch die Thermolysin-Behandlung der Thylakoide nicht degradiert wurde (Abbildung 3.5-1). Im Vergleich zum nativen Protein (Abbildung 3.5-1), das bei etwa 20 kDa migrierte, wanderte das überexprimierte Lhca1 immer etwas höhermolekularer (22kDa). Dieser Effekt war dadurch bedingt, daß das rekombinante Protein am N-Terminus zusätzliche Aminosäuren (MRGS) aufwies.

Abbildung 3.5-3 zeigt die Fluorogramme zweier Gele, bei denen die Insertionsprodukte einer Lhcb1-, sowie einer Lhca1-Insertion in einer zweiten Dimension aufgetrennt wurden. In der ersten Dimension wurden Thermolysin-behandelte solubilisierete Thylakoide unter schwach denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. In der zweiten Dimension, die unter voll denaturierenden Bedingungen stattfand, wurden die Apoproteine der einzelnen Komplexe separiert. Die Lhcb1-Insertion zeigte, daß das kürzere Degradationsprodukt DP*, wie erwartet, nur in den monomeren Komplexen auftrat. DP dagegen wurde in den monomeren, als auch in den trimeren Komplexen gefunden. Sehr wahrscheinlich, wurde dies durch die Solubilisierung der Thylakoide verursacht: Ein Protease-behandeltes Trimer, wird in jedem Apoprotein um 1 kDa am N-Terminus verkürzt. Zerfällt das Trimer nach dem Verdau, beispielsweise während der Solubilisierung zu Monomeren würden intakte Komplexe im Gel jetzt mit Monomeren wandern. Diese Komplexe bestehen jedoch aus etwas längeren Apoproteinen, die im denaturierenden Gel mit DP migrieren. DP verschob sich dabei in der zweiten Dimension etwas nach rechts. D.h. die Komplexe mit DP* (Monomere) und DP (aus zerfallenen Trimeren) hatten in der ersten Dimension ein leicht unterschiedliches Laufverhalten.

Wie bereits in Abbildung 3.5-1 gezeigt, wurde Lhca1 durch den Protease-Verdau nicht degradiert. Die radioaktiven Signale traten in den Bereichen auf, die in den grünen Komplexbanden der ersten Dimension als LHCI Monomere und Dimere, sowie als PSI interpretiert worden waren (vgl. auch Abbildung 3.5-2). In jedem Assemblierungszustand (Monomere, Dimere und PSI) war Lhca1 resistent gegenüber der Thermolysin-Behandlung.

Es konnte also gezeigt werden, daß Tomaten Lhca1 mit einem heterologen Insertionssystem stabil in Erbsenthylakoide inserierte, und, daß Lhca1 auch ohne Lhcb4 inserierte. Das Protein bildete neben Monomeren auch Dimere Komplexe. Weiterhin war eine Assemblierung an das Photosystem I (PSI) erfolgt. Das Produkt blieb in allen Assemblierungszuständen Protease-geschützt.

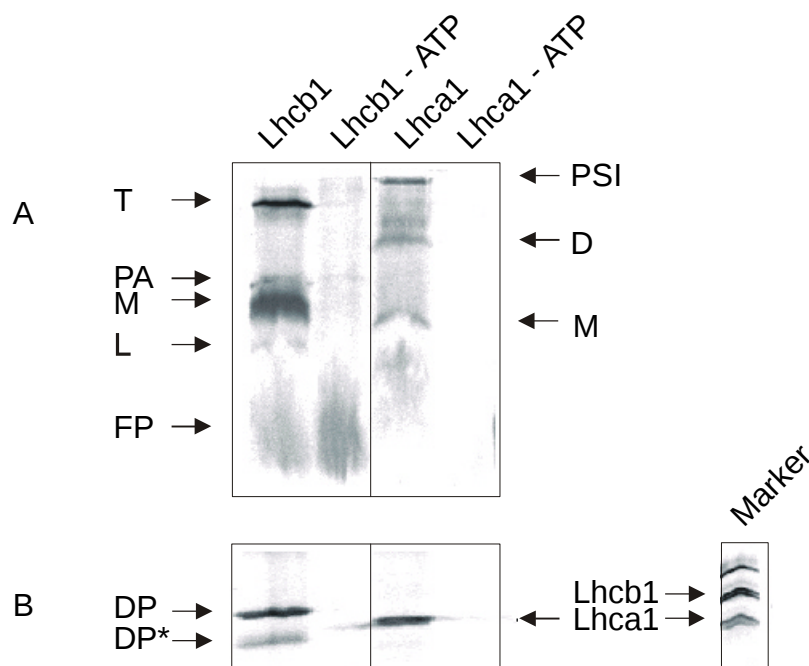


Abbildung 3.5-2 Lhca1 aus Tomate inseriert in isolierte Erbsenthylakoide. Je Klon wurden 5×10^5 cpm radioaktiv markiertes Protein in einem Standard-Insertionsansatz inseriert. Pro Versuch wurden 1,1 mg Stromaprotein eingesetzt. Lhcb1, bzw. Lhca1 = Standard-Insertionsansatz; Lhcb1-ATP, bzw. Lhca1-ATP = Insertionsansatz + 2U Apyrase/ohne ATP-Zugabe. Gel A: Membranen von 1/4 Insertionsansatz (8,5 μ g Chlorophyll) wurden nach der Thermolysin-Behandlung in einem schwach denaturierenden Gel aufgetrennt und fluorographisch dokumentiert. Gel B: Die Proteine von 1/3 Insertionsansatz (11,3 μ g Chlorophyll) wurden nach der Thermolysin-Behandlung der Thylakoide gefällt, in einem denaturierenden Gel aufgetrennt und fluorographisch dokumentiert. Expositionsdauer: 6 d; FP = freie Pigmente; L = freies, unkomplexiertes Protein; M = monomere Komplexe; PA = Proteinaggregate, die der Thermolysin-Behandlung nicht oder nur bedingt zugänglich sind. Es handelt sich hierbei nicht um stabil inseriertes Protein; T = trimere Komplexe; PSI = Photosystem I; D = Dimere; DP = Degradationsprodukt monomerer Komplexe; DP* = Degradationsprodukt trimerer Komplexe; Lhcb1 = Lichtsammelprotein von Photosystem II; Lhca1 = Lichtsammelprotein von Photosystem I.

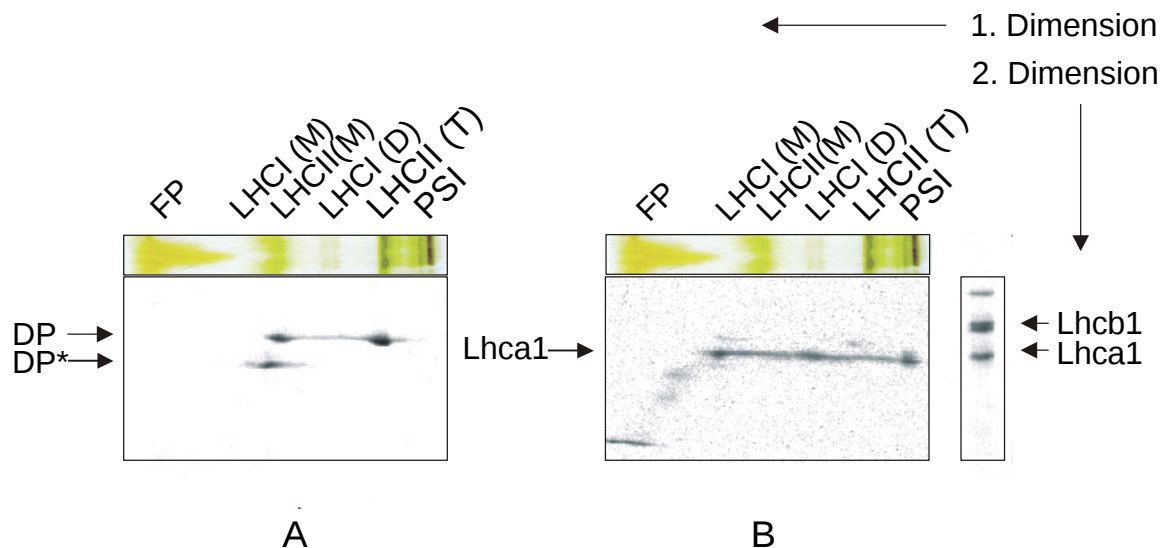


Abbildung 3.5-3 Insetierte, rekombinante Lichtsammelproteine des Photosystems I comigrieren mit LHCI-Mono- und -Dimeren sowie mit Photosystem I.

Je Klon wurden 5×10^5 cpm radioaktiv markiertes Protein in einem Standard-Insertionsansatz inseriert. Pro Insertion wurden 1 mg Erbsenstroma eingesetzt. Membranen von 1/4 Insertionsansatz (8,5 μ g Chlorophyll) wurden nach der Thermolysin-Behandlung in einem schwach denaturierenden Gel in der 1. Dimension aufgetrennt. Die Gelspur wurde nach der Trennung mit einem Skalpell ausgeschnitten und in einer 2. Dimension auf einem 12%-igem denaturierenden Gel aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend fluorographisch dokumentiert. **A:** Insertion von Lhcb1 (Klon D7f.3). **B:** Insertion von Lhca1 (*cab 6*, aus Tomate). Die Insertion fand mit Erbsenthylakoiden und Erbsenstroma statt. Expositionsdauer: 4 d; FP = freie Pigmente; M = monomere Komplexe; T = trimere Komplexe; PSI = Photosystem I; D = Dimere; DP = Degradationsprodukt monomerer Komplexe; DP* = Degradationsprodukt trimerer Komplexe; Lhcb1 = Lichtsammelprotein von Photosystem II; Lhca1 = Lichtsammelprotein von Photosystem I; LHCI = Lichtsammelkomplex des Photosystems I; LHCI = Lichtsammelkomplex des Photosystems II

Die Biogenese cpSRP-abhängiger Proteine kann mit dem etablierten Erbsen-Insertionssystem untersucht werden. Da eine möglichst hohe Homologie zu den natürlichen Verhältnissen wünschenswert ist, sollte die Assemblierung des, ursprünglich aus einem Tomaten-Gen (*cab6*) stammenden Lhca1 mit Stromaextrakt und Thylakoiden aus Tomatenpflanzen untersucht werden (Abbildung 3.5-4). Stromaextrakt und Thylakoide wurden aus Sekundär- und Tertiärblättern 21 Tage alter Tomatenpflanzen isoliert. Jüngere Tomatenpflanzen konnten nicht benutzt werden, da Tomaten sich erheblich langsamer entwickeln als Erbsen. So wären zu einem früheren Zeitpunkt die Kotyledonen das einzig grüne Blattmaterial gewesen. Bei der Chloroplasten-Isolation stellte sich heraus, daß isolierte Tomaten-Chloroplasten zur Lyse neigten, obwohl das Medium 0,33 M Sorbitol enthielt. Auch wenn die Sorbitol-Konzentration auf 0,4 M erhöht wurde, konnten die Chloroplasten nicht wesentlich stabilisiert werden. Da die Lyse der Chloroplasten mit dem Verlust an Stroma gekoppelt war, war es nicht möglich eine Stroma-Fraktion zu isolieren, die mindestens 10 mg/ml Gesamtprotein enthielt. Um dennoch möglichst vergleichbare Mengen an Stromaprotein einzusetzen, wurde der Erbsenextrakt entsprechend verdünnt. Jeweils 0,5 mg Stromaprotein wurden in einem Insertionsansatz eingesetzt. Die Ergebnisse aus dem Insertionsversuch sind in Abbildung 3.5-4 dargestellt.

Erbsen Lhcb1 inserierte mit dem homologen Erbsen-System am effektivsten. Wurden Tomatenstroma und Erbsenthylakoide verwendet, konnte Lhcb1 in geringem Maße inseriert werden. In Tomatenthylakoide wurde Lhcb1 nicht stabil eingebaut. Für die Integration von Lhca1 aus Tomate eignete sich das Erbsen-System ebenfalls am besten. Schwache Signale traten jedoch auch dann auf, wenn Erbsenthylakoide und Tomatenstroma, bzw. das homologe Tomaten-System verwendet wurden. Tomatenthylakoide zusammen mit Erbsenstroma reichten für eine stabile Insertion von Tomaten Lhca1 nicht aus. Daraus kann geschlossen werden, daß die für die Integration von Erbsen Lhcb1, aber auch Tomaten Lhca1 notwendigen Faktoren zwar prinzipiell in Tomatenstroma vorhanden waren, im Vergleich zum Erbsenstroma schien jedoch der Anteil in Tomatenstroma mit gleicher Menge an Gesamtprotein weniger zu sein. Weiterhin scheinen die Tomatenthylakoide nicht sehr Insertions-kompetent zu sein. Nur wenn Lhca1 aus Tomate unter gleichzeitiger Verwendung von Tomatenthylakoiden und Tomatenstroma für die Insertionsreaktion verwendet wurde, konnten schwache Signale beobachtet werden.

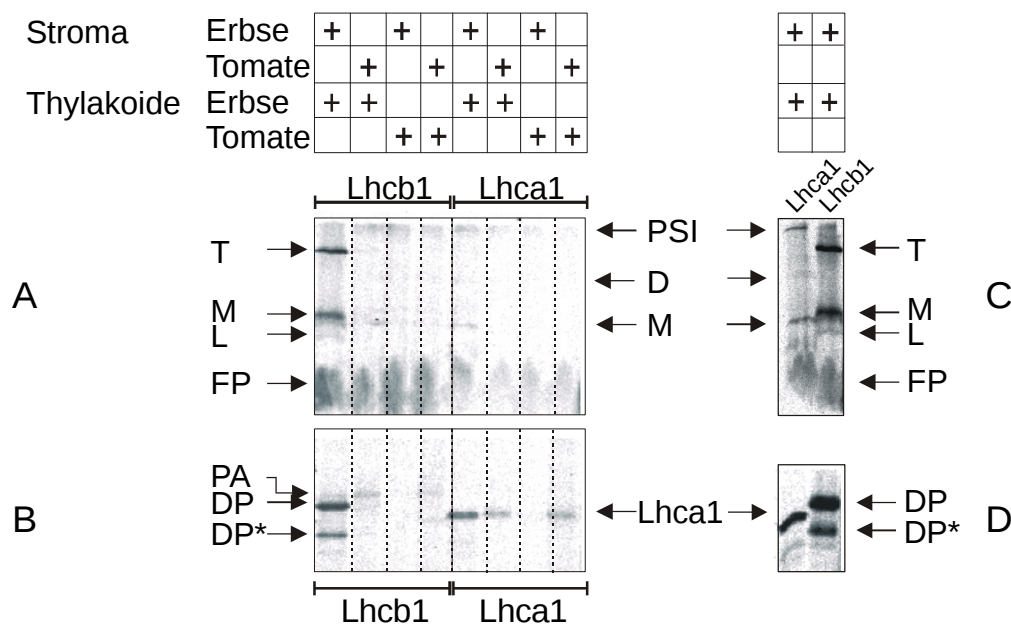


Abbildung 3.5-4 Vergleich der Insertionskompetenz mit Stroma und Thylakoiden aus Erbse und Tomate.

Je Klon wurden 5×10^5 cpm radioaktiv markiertes Protein (Lhcb1 = D7f.3; Lhca1 = cab6 aus Tomate) inseriert. Pro Insertion wurden 0,5 mg Erbsen- bzw. Tomatenstroma eingesetzt. Die Thylakoide wurden entweder aus 7 d alten Erbsenpflanzen, oder 21 d alten Tomatenpflanzen isoliert. Von den Tomatenpflanzen wurden nur Sekundär- oder Tertiär-Blätter verwendet. **A:** Membranen von 1/4 Insertionsansatz (8,5 µg Chlorophyll) wurden nach der Thermolysin-Behandlung in einem schwach denaturierenden Gel aufgetrennt und fluorographisch dokumentiert. **B:** Die Proteine von 1/3 Insertionsansatz (11,3 µg Chlorophyll) wurden nach der Thermolysin-Behandlung der Thylakoide gefällt, in einem denaturierenden Gel aufgetrennt und fluorographisch dokumentiert. **C und D** entsprechen der Insertion in A und B mit dem Erbsen-System, jedoch wurde hier die doppelte Menge an Erbsenstroma eingesetzt. Expositionsdauer: 4 d; FP = freie Pigmente; L = freies, unkomplexiertes Protein; M = monomere Komplexe; PA = Proteinaggregate, die der Thermolysin-Behandlung nicht oder nur bedingt zugänglich sind. Es handelt sich hierbei nicht um stabil inseriertes Protein; T = trimere Komplexe; PSI = Photosystem I; D = Dimere; DP = Degradationsprodukt monomerer Komplexe; DP* = Degradationsprodukt trimerer Komplexe; Lhcb1 = Lichtsammelprotein von Photosystem II; Lhca1 = Lichtsammelprotein von Photosystem I.

Daß die Stroma-Qualität eine besonders wichtige Rolle für die Effizienz der Proteinintegration in die Thylakoide spielt, wurde bei folgendem Experiment deutlich (Abbildung 3.5-4C und D). Lhcb1 und Lhca1 wurden unter gleichen Bedingungen inseriert wie in A u. B, jedoch wurde die doppelte Menge an Erbsenstroma zugegeben. Mit doppelter Stroma-Menge wurden mindestens 4-fach stärkere Signale beobachtet.

3.6 Insertion von Chlorophyll-Liganden-Mutanten in isolierte Erbsenthylakoide

Auf der Grundlage des derzeitigen LHCII-Strukturmodells (Kühlbrandt *et al.*, 1994) wurden einzelne, an der Chlorophyll-Bindung beteiligte Aminosäuren, so ausgetauscht, daß eine Chlorophyll-Bindung an dieser Position unwahrscheinlich erscheint. In der Arbeitsgruppe wurden die Mutanten auf ihre Pigmentbindungs-Eigenschaften und Komplex-Stabilität durch die *in vitro*-Rekonstitution untersucht (Yang *et al.*, 1999). Die Untersuchung der Insertions- und Oligomerisierungskompetenz dieser Mutanten war Teil dieser Doktorarbeit.

Folgende Mutanten wurden untersucht:

Mutante	Chlorophyll/Helix (Kühlbrandt <i>et al.</i> , 1994)
H212F	b3/D
H212L	b3/D
Q197E	a3/A
Q197S	a3/A
Q131E	b6/C
Q131S	b6/C
H68L	a5/B
H68F	a5/B
H68L/E65Q	a4a5/B

Tabelle 3.6-1 Chlorophyll-Liganden-Mutanten

Auf dem schwach denaturierenden Gel (Abbildung 3.6-1 A) wurden trimere und monomere Komplexe (T und M), sowie freies, nicht mit Pigmenten komplexiertes Apoprotein (L) voneinander getrennt. Die Stärke des Signals, das von monomeren Komplexen stammte, war mit der Stabilität der Pigment-Protein Komplexe *in vitro* vergleichbar (Yang *et al.*, 1999). Die Mutanten H212 und das Wildtyp-Protein erwiesen sich als sehr stabil und lieferten auch im Vergleich zum nicht komplexierten Protein (L) starke Signale in den Monomerbanden (M). Die Q197 Mutanten zeigten *in vitro* eine mittlere Stabilität und auch in diesem Versuch waren die Signale der inserierten Produkte mittelstark. Das Trimer : Monomer-Verhältnis war etwas größer als bei den H212-Mutanten. Dagegen zeigten Komplexe, die auch *in vitro* sehr instabil waren, wie z.B. die Q131 Mutanten weniger starke Signale in der Monomer-Bande. Bei Mutante Q131S schienen die monomeren Komplexe bereits durch die Wasch- und Solubilisierungsschritte, bzw. während der schwach denaturierenden Gelelektrophorese zerfallen zu sein. Hier konnte auf der Höhe der Monomere kein Signal mehr detektiert werden. Insgesamt schwache Ausbeuten an monomeren Komplexen lieferten die Klone mit Mutationen

an H68, bzw. die Doppelmutante H86L/E65Q. Diese Proteine inserierten insgesamt am schlechtesten. Weder die Banden M noch L lieferten hier besonders intensive Signale.

Nur einige der Mutanten wanderten mit trimerem LHCII im schwach denaturierenden Gel. Die Mutante Q131S, sowie die Mutanten, die an H68 verändert worden waren, schienen die Fähigkeit, Trimere auszubilden, verloren zu haben. Diese Annahme wird durch Abbildung 3.6-1 B unterstützt: Bei allen Mutanten, die keine Trimer-Bande im schwach denaturierenden Gel aufwiesen, fehlte im voll denaturierenden Gel auch das für Trimere typisches Degradationsprodukt DP.

Bei der H68L/E65Q Doppelmutante erschien zusätzlich zu inseriertem Protein auch Voll-längenprotein im Gel, was auf eine Aggregation dieses Proteins hindeutet. Weiterhin konnte beobachtet werden, daß Mutationen in H212 weniger starke Trimerisierungssignale lieferte als die trimerisierenden Mutanten aller anderen Klone.

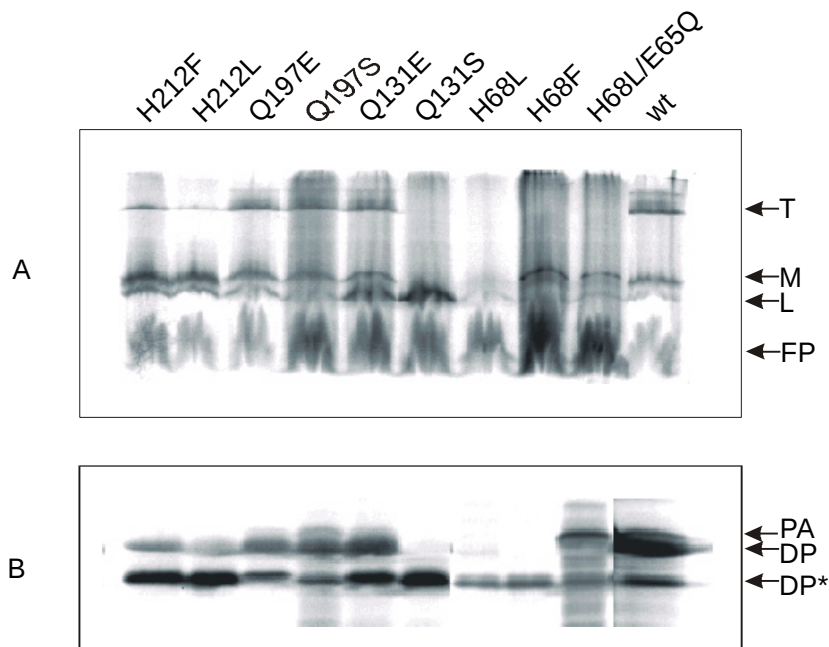


Abbildung 3.6-1 Mutationen im Lhcb1-Gen beeinflussen sowohl die Insertionseffizienz als auch die Oligomerisierung inserierter Lichtsammelproteine. Je Klon wurden 5×10^5 cpm radioaktiv markiertes Protein in einem Standard-Insertionsansatz inseriert. Pro Insertion wurden 1,2 mg (bzw. 1 mg Gel B Spuren 7-9) Stromaprotein eingesetzt. Gel A: Membranen von 1/4 Insertionsansatz (8,5 μ g Chlorophyll) wurden nach der Thermolysin-Behandlung in einem schwach denaturierenden 15%-igen Gel aufgetrennt und fluorographisch dokumentiert. Gel B: Die Proteine von 3/8 Insertionsansatz (12,75 μ g Chlorophyll) wurden nach der Thermolysin-Behandlung der Thylakoide gefällt, in einem denaturierenden Gel aufgetrennt und fluorographisch dokumentiert. Expositionsdauer: 5d: Gele A und B Spuren 1-6 + 10; 4d: Gel B Spuren 7-9; FP = freie Pigmente; L = freies, unkomplexiertes Protein; M = monomere Komplexe; PA = Proteinaggregate, die der Thermolysin-Behandlung nicht oder nur bedingt zugänglich sind. Es handelt sich hierbei nicht um stabil inseriertes Protein; T = trimere Komplexe; DP = Degradationsprodukt monomerer Komplexe; DP* = Degradationsprodukt trimerer Komplexe.

4 Diskussion

4.1 Die Hexahistidyl-Verlängerung von Lhcb1 als Affinitäts-Markierung

In der vorliegenden Arbeit wurde mit rekombinanten Lichtsammelproteinen gearbeitet, die an verschiedenen Positionen mit einem "His-Tag" markiert wurden. Diese Markierung hat folgende Eigenschaften: Sie ist durch die genetisch determinierte Lage im Protein hochspezifisch. Alle Proteine werden gleich stark markiert. Für den Nachweis des Hexahistidyl-markierten Proteins stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung (siehe Kapitel 2.2.6.2). Schließlich kann ein "His-Tag" als Affinitäts-Markierung dienen, mit der das Protein nicht nur nachgewiesen, sondern auch aus einem Protein-Gemisch angereichert und isoliert werden kann. "His-Tags" scheinen die funktionelle Struktur von Proteinen kaum zu beeinflussen. In vielen Fällen kann rekombinantes Protein in funktioneller Struktur isoliert werden. Aus diesem Grund wird ein "His-Tag" sehr häufig als Affinitäts-Markierung verwendet (Übersichtsartikel siehe Referenzen in Qiagen-Handbuch "TheQIA-expressionist", 1997). Bei der sogenannten Metall-Affinitäts-Adsorption treten Proteine, die einen Chelator als Affinitäts-Markierung tragen, und Metallionen (z.B. Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+}), die an einen Träger immobilisiert sind, miteinander in Wechselwirkung. Die Immobilisierung des Metalls dient dazu, die Tendenz zur Bildung von Kreuzverknüpfungen zwischen Metallionen und Proteinen herabzusetzen (Porath und Ohlin, 1983). In der Regel wird eine Abfolge von 5-6 Histidin-Resten als Affinitäts-Markierung verwendet, da der Imidazol-Ring eine hohe Affinität zu den o.a. Metallionen aufweist.

4.1.1 Die "His-Tag"-Position im Lhcb1 des beeinflusst die Nachweisreaktion

Es ist wichtig, daß die Markierung im Protein für eine Interaktion mit Metallionen zugänglich ist. Der Grad der Selektivität und der Affinität der Markierung für das Metallion kann in Proteinen von benachbarten Aminosäuren beeinflusst werden. Benachbarte große Seitenketten können sterische Charakteristika der Proteindomäne beeinflussen, geladene Aminosäuren können einen Effekt auf den pK_R -Wert der Histidine haben; auch die Nettoladung des gesamten Proteins kann die Interaktion beeinflussen.

Die Position des "His-Tags" hatte im Versuch tatsächlich eine Auswirkung auf den Nachweis der Lhcb1-Derivate. Proteine, die innerhalb der Lhcb1-Primärsequenz markiert waren, wurden auf dem Western-Blot immer schwächer angefärbt als Proteine, mit N- oder C-terminaler Markierung. Zu den intern markierten Proteinen zählten D7AH2 mit dem "His-Tag" im stromalen Loop und D7PH11 mit dem "His-Tag" N-proximal der ersten Transmembran-Helix (TMH). Die schwächeren Signale traten auf, obwohl gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden und die Proteine denaturiert vorlagen (Gele nicht gezeigt). Hier muß die Proteinumgebung einen Einfluß auf die Zugänglichkeit des "His-Tags" gehabt haben. Die Vermutung, eines räumlichen Effekts, wurde dadurch gestützt, daß die Nachweisunterschiede unabhängig von der Nachweismethode auftraten. Sowohl bei der biochemischen Nachweismethode mit Ni-NTA-AP (vgl. Kapitel 2.2.6.2.1) als auch bei der immunologischen Nachweismethode mit Anti-Histidin-Antikörpern (2.2.6.2.2) wurden die oben genannten Lhcb1-Derivate schlechter detektiert, als die terminal markierten. Für die weiteren Versuche, welche die Wechselwirkung

zwischen "His-Tags" und immobilisierten Metallionen zur Grundlage hatten, wurden daher fortan nur die besser detektierbaren Proteine mit C- (C3.2h) oder N-terminaler (44C.3) Markierung verwendet (Kapitel 3.3).

4.1.2 Chloroplastenproteine binden unspezifisch an Metall-beladene Magnetpartikel

Für Klon C3.2h sind bereits *in vitro* Faltungsexperimente beschrieben, die auf der Interaktion zwischen "His-Tags" und immobilisierten Metallionen (Ni-NTA) beruhen (Rogl *et al.*, 1998). Das Lhcb1-Derivat wurde hier reversibel an eine Ni-NTA-Agarose-Säule gebunden und mit relativ kleinem Zeit- und Materialaufwand unter "Trimerisierungs-Bedingungen" (Pigmente, Lipide siehe auch Hobe *et al.*, 1994 und Hobe *et al.*, 1995) zu LHCII rekonstituiert. Neben LHCII-Monomeren konnte mit dieser Methode trimeres LHCII rekonstituiert werden.

Für manche Experimente ist es erforderlich, die Probe möglichst schnell und in hoher Konzentration zurückzugewinnen. Je nach Säulenvolumen und Bindekapazität ist jedoch die Wartezeit für das Spülen der Säule und das Volumen der benötigten Lösungen (z.B. Binde- Wasch- und Elutions-Puffer) vorgegeben. Aus diesem Grunde schienen paramagnetische Partikel als Träger für den Ni-NTA-Komplex eine praktische Alternative zu sein. Aufgrund der magnetischen Eigenschaften können Lösungen schnell abgesaugt werden, während die Partikel mit Hilfe eines Magneten an der Wand des Probengefäßes immobilisiert werden (siehe Kapitel 2.6 und 3.3). Zwei unterschiedliche Partikelarten standen zur Verfügung und wurden auf eine spezifische und reversible Bindung der Klone C3.2h und 44C.3 (Kapitel 2.1; 3.1 und 3.3) getestet. Zur Verfügung standen zunächst nur DTPA-gekoppelte, nicht mit Metallionen komplexierte Dextranpartikel. Diese wurden mit Ni^{2+} gesättigt, und getestet, ob darauffolgend eine Bindung von Hexahistidyl-markiertem Lhcb1 möglich ist. Zunächst wurde bei den Partikeln zunächst die Nickel-Bindekapazität mit dem AAS bestimmt (siehe Kapitel 2.6.1 und 3.3.1). Diese lag mit ca. 68 nmol Ni^{2+} /mg Partikel höher, als die vom Hersteller geschätzten Angaben. DTPA mit acht Koordinationsstellen hatte wahrscheinlich alle sechs Valenzen von Ni^{2+} komplexiert, so daß keine freien Valenzen für die Bindung des Histidins zur Verfügung standen. Wegen der Stärke der Ni-Komplexierung war eine Verdrängungsreaktion durch Histidin nicht zu erwarten. Im folgenden wurde nur noch mit NTA-Partikeln gearbeitet, da mit NTA nur vier Koordinationsstellen besetzt werden können, so daß zwei weitere für die Bindung von Histidin verbleiben (siehe auch Kapitel 2.2.6.2.1).

C-, bzw. N-terminal markiertes "His-Tag"-Lhcb1 konnten an beide NTA-Partikelarten gebunden und mit einem etwas veränderten Elutions-Puffer auch wieder von den Partikeln eluiert werden (siehe Kapitel 3.3.2). Allerdings gab es Probleme mit der Bindespezifität der Partikel. Wurde bei den anfänglichen Experimenten zunächst nur bei Xenopore Latex-Partikeln eine Bindung von Lysozym aus der Proteinlösung festgestellt, so zeigte sich bei den Folgeexperimenten auch bei den nanomag Dextranpartikeln ein unspezifisches Bindeverhalten. Wurden Partikel, die entweder Lhcb1-frei oder mit "His-Tag"-Lhcb1 beladen, waren in Anwesenheit von Stroma-Proteinen inkubiert, so interagierte ein breites Spektrum dieser stromalen Proteine mit den Partikeln. Dieser Effekt war unabhängig davon, ob Lhcb1 zuvor an die Partikel gebunden wurde oder nicht. Damit konnte also der Frage nicht nachgegangen werden, ob Partikel-gebundenes Lhcb1 spezifische Wechselwirkungen mit stromalen Proteinen eingehen würde, und ob diese gegebenenfalls zusammen mit Lhcb1 eluiert werden könnten (Kapitel 3.3.3). Auch der Versuch das Protein unter Insertionsbedingungen zu inkubieren zeigte, daß dies aufgrund der unspezifischen Bindung von Stroma- und Thylakoid-Proteinen nicht möglich war. In diesen Versuchen konnte selbst das gebundene "His-Tag"-Lhcb1 nicht mehr zurückgewonnen werden (Kapitel 3.3.4). Dies deutet darauf hin, daß "His-Tag"-Lhcb1 im Chloroplastenextrakt proteolytisch abgebaut wurde. Versuche von Chitnis *et al.*, 1987 und Kuttkat *et al.*, 1997 hatten gezeigt, daß nicht in Thylakoiden assembliertes Protein im Chloroplasten degradiert wird. Wenn das Verschwinden des C-, bzw. des N-terminal markiertem Lhcb1 tatsächlich auf einer proteolytischen Degradation beruhte, dann ist dies ein Hinweis darauf, daß diese endoproteolytisch angreifen können, denn C-, bzw. der N-Terminus wäre im gebundenen Zustand, als "His-Tag"-Ni-NTA-Komplex höchstwahrscheinlich für einen C- oder N-terminalen Angriff durch Exoproteasen blockiert. Diese Frage wurde jedoch in diesem Versuch nicht weiter untersucht.

Woher die unspezifischen Bindungen der Proteine stammen ist unklar. Sicherlich sind einige auf eine Interaktion von Nickel-NTA mit Metall-bindenden Proteinen zurückzuführen. Im Chloroplasten findet man sehr viele Proteine dieser Art (Merchant und Dreyfuss, 1998). Diese binden das Metall entweder direkt an das Apoprotein, oder indirekt über anorganischen Zentren bzw. über einen organischen Cofaktor (Tabelle 4.1-1).

Metall-Cofaktor	Holoprotein (Komplex)	Kompartimen
1. direkte Koordination mit dem Apoprotein		
Cu	Plastocyanin, Polyphenol-Oxidase,	Lumen
	D1, D2	Thylakoid
	Superoxid-Dismutase Hydrogenase, Ferritin,	Stroma
	Lipoxygenase,	Hüllmembr
Zn	Carboanhydrase, Stroma-Peptidase	Stroma
	MGDG Synthase,	Hüllmembran
	AcetylCoA-Carboxylase	n.d.
2. Anorganische Zentren		
Fe ₂ -S ₂	Rieske-Protein, Ferrochelatase	Thylakoid
	Ferredoxin, Cholin-Monooxygenase	Stroma
Fe ₄ -S ₄	F _x von PSI-RZ (PsaA,PsaB)	Thylakoid
Fe ₄ -S ₄ Sirohäm	Ferredoxin-Nitrit-Reduktase	Stroma
Mn ₄ -Cluster (4Mn,1Ca, 1Cl)	OE	Lumen
3. Organische Cofaktoren		
Cytochrom vom b-Typ	b ₅₅₉ , b ₆	Thylakoid
Cytochrom vom c-Typ	cyt f cyt c ₆	Thylakoid
Häm	Katalase	Lumen

Tabelle 4.1-1 Beispiele von Metalloproteinen im Chloroplasten aus Merchant und Dreyfuss, 1998
n.d. = nicht bestimmt, Mg²⁺-Proteine werden wegen ihrer relativ schwachen Interaktion nicht als Metalloproteine bezeichnet.

Nach Lippard und Berg, 1994, sind in der folgenden Tabelle (4.1-2) Ligandenpräferenzen für bestimmte Metallionen aufgelistet. Diese geben jedoch nur Anhaltspunkte für mögliche Bindestellen in Proteinen:

Metall	Ligand		
Mn ²⁺	H ₂ O	OH ⁻	Sauerstoff
Fe ³⁺ /Fe ²⁺	ROH	RO ⁻	
Mg ²⁺	PO ₄ ³⁻	ROPO ₃ ²⁻	
Ca ²⁺	R-CH ₂ COO ⁻	CO ₃ ²⁻	
	RNH-COO ⁻	RNH ₂	
Fe ²⁺ Ni ²⁺ Zn ²⁺ Co ²⁺ Cu ²⁺ /Cu ³⁺	Imidazolyl- stickstoff		Stickstoff
Cu ⁺	R ₂ S RSH	RS ⁻	Schwefel

Tabelle 4.1-2 Ligandenpräferenzen für Metallionen

Zink- und Kupfer-bindende Proteine, wie die Stroma-Peptidase, Carboanhydrase, Plastocyanin, Polyphenol-Oxidase, D1- und D2-Protein des PSII kommen für eine Bindung an die Metall-beladenen Partikel besonders in Frage. Neben Van-der-Waals-Kräften und sterisch bedingter Verteilung von Thylakoid-Proteinen spielen die elektrostatische Kräfte der Kationen eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung der physiologischen und strukturellen Eigenschaften im Chloroplasten. Sie sind an der Segregation der Photosysteme, dem "Stacking" der Membranen, der Lipid –Verteilung in der Membran, sowie an der Ausbildung spezifischer Protein-Protein und Protein-Lipid Wechselwirkungen beteiligt. Dabei treten sowohl unspezifische, als auch spezifische elektrostatische Wechselwirkungen auf. (Übersichtsartikel siehe Stys, 1995).

Betrachtet man den Ionengehalt von Chloroplasten 8-10 Tage alter Erbsenpflanzen, so findet man im Durchschnitt folgende Zusammensetzung (Nakatani *et al.*, 1979):

Element	$\mu\text{mol/mg Chl}$
Na	0,22
K	2,56
Mg	1,72
Ca	0,76
Cl	0,21
Mn	0,017

Dabei wurde Magnesium als das Haupt-Kation der Thylakoid-Oberfläche und Kalium als das Haupt-Kation des Stromas identifiziert. Es ist daher denkbar, daß auch solche Proteine, die zwar nicht zu den Metall-bindenden Proteinen gezählt werden, eine Affinität zu den plastidären Kationen aufweisen und daher auch im Vergleich mit den Metallionen der Magnetpartikel interagiert haben könnten. Weiterhin könnte ein Teil der Proteine unspezifisch an der Partikel-Oberfläche aggregiert sein, sobald der Überstand der Lösung aus dem Reaktionsgefäß abgehoben wurde. Auch direkte Wechselwirkungen mit der Trägersubstanz (Dextran ein α -1,6-Glucan, bzw. Latex ein (z)-1,4-Polyisoprenoid) sind vorstellbar. Dennoch kann nicht endgültig geklärt werden, weshalb das ganze Spektrum stromaler Proteine an die Partikel gebunden wurde. Aufgrund dieser Interaktionen von Chloroplastenproteinen mit den Metall-beladenen, paramagnetischen Partikeln, wurden diese nicht weiter verwendet.

4.2 Ein "His-Tag" im Lhcb1 behindert nicht die *in-vitro*-Rekonstitution von LHCII-Monomeren

Die Rekonstitutionsexperimente lieferten wichtige Daten zur Charakterisierung Hexahistidyl-markierter Lhcb1-Derivate. Mit diesen Experimenten wurde untersucht, inwiefern die Einführung der sechs Histidin-Reste die Pigment-Bindungseigenschaften und damit die Faltungskompetenz von Lhcb1 beeinflußt haben. Dies ist gerade für die Interpretation der Ergebnisse aus den Insertionsexperimenten wichtig (siehe Kapitel 3.4). Der Nachweis von stabil inseriertem Lhcb1 ist davon abhängig, ob es Pigment-gebunden vorliegt, d.h. zu einem funktionellen LHCII assembliert wurde. Nur gefaltetes, mit Pigmenten beladenes Protein ist vor einer proteolytischen Degradation geschützt (Chitnis *et al.*, 1987; Kuttkat *et al.*, 1997).

Die Rekonstitutionsversuche zeigten, daß sich alle untersuchten Lhcb1-Derivate *in vitro* zu LHCII falteten. Selbst in Anwesenheit hoher Ni^{2+} -Konzentrationen wurde die LHCII-Ausbeute der Derivate im Vergleich zum Wildtyp-Protein nur unwesentlich herabgesetzt (Kapitel 3.2). Ein stärker abweichendes Faltungsverhalten zeigte Klon D7AH2 mit dem "His-Tag" in der stromalen Schleife. Das Protein faltete sich zwar zu LHCII, diese Komplexe waren jedoch instabiler, als alle anderen Hexahistidyl-markierten Klone. Erkennbar war dies am Pigmentverlust während der elektrophoretischen Auftrennung der Pigment-Protein Komplexe im schwach denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gel. Dieser Pigmentverlust war von der Ni^{2+} -Zugabe unabhängig. Es ist nicht auszuschließen, daß die Histidin-Reste in der stromalen Schleife eine unspezifische Assoziation von Chlorophyllen bewirkt hat, die sich dann während der Elektrophorese wieder lösten. Diese Vermutung erwies sich als unwahrscheinlich, denn die rekonstituierten Komplexe des Klons D7AH2 waren wesentlich empfindlicher gegenüber einer Thermolysin-Behandlung als die anderen "His-Tag"-Proteine. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Protease-behandelten Komplexe auf einem schwach denaturierenden Gel mit anschließender Coomassie-Färbung, war ein blau gefärbter Hintergrund in der Bahn von D7AH2 sichtbar (Gele nicht abgebildet). Dieser Hintergrund deutete auf LHCII hin, das wegen seiner Instabilität während des Protease-Verdaus zerfallen sein könnte und daher zum Teil verdaut wurde. Die Komplex-Instabilität schien also tatsächlich die Ursache für die geringere Ausbeute gewesen zu sein. Die Kühlbrandt-Struktur (Kühlbrandt *et al.*, 1994) gibt einen Hinweis auf die Ursache der Instabilität dieses Klons. Die beiden Aminosäuren Prolin¹⁴⁷ und Leucin¹⁴⁸, zwischen denen die Hexahistidyl-Gruppe in D7AH2 positioniert ist, befinden sich in der Nähe von Chl *b1*. Dieses Chl scheint anhand der Elektronenkristallographischen Analyse von LHCII-2-D-Kristallen zwar keinen Aminosäure-Rest als Liganden zu haben, dennoch könnte ein eingebrachter "His-Tag" die Struktur der an die Loop-Domäne grenzenden Helix C derart verändert haben, daß die Stabilität der Chl *b1*-Bindung und eventuell auch der des für das ganz in der Nähe befindlichen Chl *b5* herabgesetzt war, und damit der Komplex insgesamt destabilisiert wurde (siehe Abbildung 4.2-1).

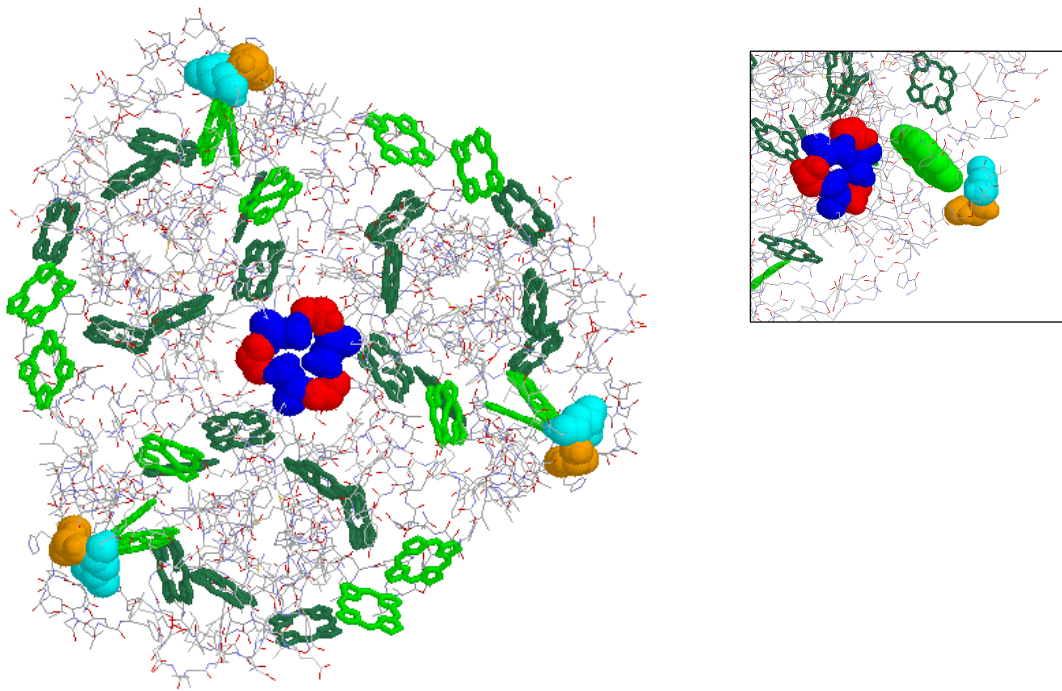


Abbildung 4.2.-1 "His-Tags" im LHCII-Trimer bei den Lhcb1-Derivaten D7AH2 und D7PH11.

Aminosäuren, die den "His-Tag" des Klons D7PH11 flankieren, sind rot (Ala⁵³) und blau (Asp⁵⁴) dargestellt. Aminosäuren, die den "His-Tag" des Klons D7AH2 flankieren, sind orange (Pro¹⁴⁷) und hellblau (Leu¹⁴⁸) unterlegt. Die Chlorophylle sind dunkelgrün (Chl *a*) und hellgrün (Chl *b*) markiert. Der Ausschnitt rechts zeigt die Nähe von Pro¹⁴⁷ und Leu¹⁴⁸ zu Chl *b*1. Nach Kühlbrandt, MPI für Biophysik, Frankfurt /Main.

Daß die C- und N-terminalen Hexahistidyl-Verlängerungen am Lhcb1 die Faltungseigenschaften des LHCII nicht beeinflussen, war zu erwarten, da, N-terminal, bzw. an einem C-proximalen Cystein (Doppelmutante C80S/V229C) Biotin-markiertes pLhcb1 in Detergens-Mizellen rekonstituiert werden kann (Kuttkat, Dissertation, 1997). Genauso kann N- oder C-terminal mit GFP fusioniertes (p)Lhcb1 rekonstituiert werden (Geiger, Diplomarbeit, 1998). Weiterhin sind bis zu einem gewissen Grad sind auch verkürzte Proteine noch in der Lage, sich *in vitro* zu monomerem LHCII zu falten. Während Verkürzungen am C-Terminus schon sehr bald zur Bildung von instabilen Komplexen führen, können am N-Terminus eine ganze Reihe von Aminosäuren entfernt werden, ohne daß die Faltung gravierend beeinflußt wird (siehe Tabelle 4.2-1). An beiden Termini scheinen die Komplex-stabilisierenden Wechselwirkungen vor allem hydrophober Natur zu sein, denn mit den Deletionsanalysen wurde jeweils ein Tryptophan (Trp¹⁶, und Trp²²²) als kritischste Aminosäure identifiziert, wobei Trp¹⁶ für die Stabilisierung trimerer Komplexe notwendig ist (Hobe *et al.*, 1995, Kuttkat *et al.*, 1996). Auch die Tatsache, daß beide Protein-Termini in der Elektronenkristallographischen Analyse nicht gut aufgelöst werden konnten, spricht dafür, daß sie keine feste Position im Komplex aufweisen und daher für die Strukturgebung nicht absolut notwendig zu sein scheinen (Kühlbrandt *et al.*, 1994).

Mutante	Sequenz (C- bzw. N-terminal)	Rek/M	Ins/T
LHCP	MRKSATTKKVASSGSPWYGPDRV KYLGPFSGESPSYLTGEFPGDYGWD TAG LSADPETFSKNRELEVIHSRWAM.....	+	+
ΔN15	MWYGPDRV KYLGPFSGESPSYLTGEFPGDYGWD TAG LSADPETFSKNRELEVIHSRWAM.....	+	+
ΔN17	MGPDRV KYLGPFSGESPSYLTGEFPGDYGWD TAG LSADPETFSKNRELEVIHSRWAM.....	+	-
ΔN61	SRELEVIHSRWAM.....	+	-
ΔN66	MIHSRWAM.....	-	-
pLHCP	QAIVTGKGPLENLADHLADPVNNNAWSYATNFVPGK	+	+
ΔC225	QAIVTGKGPLENLADHLADPVNNNAWSYA.....	+	- a)
ΔC223	QAIVTGKGPLENLADHLADPVNNNAWS.....	+	- a)
ΔC221	QAIVTGKGPLENLADHLADPVNNNA.....	+	-
ΔC219ELN	QAIVTGKGPLENLADHLADPELN.....	+	-
ΔC209LN	QAIVTGKGPLELN.....	-	-

Tabelle 4.2-1 Rekonstitutions- und Trimerisierungskompetenz verkürzter (p)Lhcb1-

Derivate Rek/M = Rekonstitution von Monomeren *in vitro*; Ins/T = Trimerisierung im Insertionsexperiment a) = Trimerisierung in Detergens/Lipid-Mischmizellen. Zusammengefaßt in Kuttkat, Dissertation, 1997.

4.3 Topographische Aspekte zur Insertion von "His-Tag"-Lhcb1 in isolierte Erbsen-thylakoide

Während ein Teil der stromalen Komponenten, die für die Lhcb1-Zielsteuerung notwendig sind, bereits identifiziert und zum Teil charakterisiert wurden, (Li *et al.*, 1995, Schuenemann *et al.*, 1998; Kogata *et al.*, 1999), ist über den molekularen Mechanismus der Lhcb1-Insertion in die Thylakoidmembran nur sehr wenig bekannt. Kürzlich wurde in *Arabidopsis* ein dem bakteriellen SRP-Rezeptor FtsY homologes Chloroplastenprotein gefunden (cpFtsY). Das Protein wurde vor allem in der Stroma-Fraktion nachgewiesen, scheint aber auch eine hohe Affinität zur Thylakoidmembran zu haben. (Kogata *et al.*, 1999). Mit der Identifizierung und anschließenden *in vitro*-Synthese dieses Proteins konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß die drei stromalen Faktoren, cpFtsY, cpSRP43 und cpSRP54 notwendig und ausreichend sind, um Lhcb1 in isolierte Thylakoide zu inserieren (Tu *et al.*, 1999). Ein Translokationskomplex in Thylakoidmembranen wurde bisher nicht identifiziert. Die Tatsache, daß Protease-behandelte Thylakoiden nicht mehr in der Lage sind, Lhcb1 *in vitro* zu inserieren, spricht jedoch für die Beteiligung eines solchen Apparates in der Membran (Robinson *et al.*, 1996).

Welche Topographie das integrale Membranprotein während der Translokation einnimmt, wurde bisher nicht untersucht. Allgemeine Determinanten für die Topographie eines Membranproteins sind Erkennungs- und Interaktionsmechanismen zwischen membranständigen Helices sowie elektrostatische Interaktionen zwischen verschiedenen Protein-Domänen bzw. Protein-Untereinheiten. Weiterhin spielt die Verteilung positiv geladener Reste in Protein-Regionen, die Transmembransegmente flankieren, eine wichtige Rolle für die Protein-Orientierung in der Membran. Die „positive inside rule“ (auch *cis*-positive rule) besagt, daß Regionen, die reich an positiven Resten sind, tendenziell nicht translociert werden (von Heijne 1995, Spiess 1995). Neben Plasmamembranproteinen scheint diese Regel auch für bisher untersuchte integrale Membranproteine von Thylakoiden und Mitochondrien zu gelten (Gavel *et al.*, 1991; Gavel und von Heijne, 1992). Allerdings findet man in den Stroma-seitigen, die Transmembran-

Helices (TMH) flankierenden Abschnitten, von Lhcb1- keine Akkumulation positiv geladener Aminosäuren, welche auf Helix-orientierende Signale hinweisen würden. Für die Untersuchung von Translokations-Determinanten kommt bei Lhcb1 erschwerend hinzu, daß das Protein nur die N-terminale Signalsequenz für den Plastiden-Import, jedoch kein zweites Transit-Peptid für die Zielsteuerung in die Thylakoidmembran trägt. Solche Signale (lumenal targeting domain; LTD) findet man bei Proteinen, die in das Thylakoidlumen transportiert werden (Klöggen, 1997, Schnell, 1998, Robinson *et al.*, 1998). Bei Lhcb1 steckt die Information für den Einbau in die Thylakoid Membran in einer nicht spaltbaren Domäne des maturen Proteins selbst. Um welche Domäne es sich hierbei handelt konnte bereits gezeigt werden:

Es wurde zunächst beobachtet, daß die Affinität von cpSRP54, das für die Insertion von Lhcb1 in die Thylakoidmembran essentiell ist, zu einer SRP-Zielsequenz mit deren Hydrophobizität korreliert (High *et al.*, 1997). Im Vergleich zu den beiden anderen α -Helices, weist der dritte TMH die höchste Hydrophobizität auf (errechnet nach von Heijne, 1987). Tatsächlich stellte sich heraus, daß cpSRP54 vor allem mit dem dritten TMH interagiert. Schon frühere Importexperimente mit deletierten pLhcb1-Derivaten hatten gezeigt, daß der C-proximale Bereich für die Insertion von Lhcb1 essentiell ist (Kohorn *et al.*, 1986) und daß der dritte MDB, nicht aber der erste oder zweite ausreicht, um Fusionsproteine (kleine Untereinheit der Ribulose1,5-Bisphosphat Carboxylase, SSU) mit der Thylakoidmembran zu assoziieren und zumindest teilweise in Thylakoide zu inserieren (Kohorn und Tobin, 1989). Ob neben den stromalen Transit-Faktoren (SRP) auch ein thylakoidaler Translokationsapparat existiert, konnte bis heute nicht geklärt werden. Die Untersuchung der Protein-translokation mit bakteriellen Plasmamembranproteinen sprechen dafür: Es wurde gezeigt, daß die Hydrophobizität einer Signaldomäne dafür entscheidend sein kann, ob ein Protein spontan oder assistiert transportiert wird. Bei dem "Procoat-Protein" des Bakteriophagen M13 handelt es sich um ein Protein, das spontan in die Plasmamembran von *E.coli* integrieren kann. Ein rekombinantes Derivat des M13-Procoatproteins (H1-Procoat), besitzt ein Signalpeptid, das eine wesentlich größere Hydrophobizität aufweist als das Wildtyp-Protein, inseriert dagegen nicht mehr spontan in die Membran. Die Mutation des Signalpeptids hatte dazu geführt, daß der Transport fortan vom cotranslationalen bakteriellen SRP-Zielsteuerungs-, sowie dem SecE/Y-Translokationsmechanismus abhängig wurde (De Gier *et al.*, 1998). Es wurde diskutiert, daß die Bindung von bakteriellem SRP an die Signalsequenz einer wachsenden Ribosomen-gebundenen Polypeptidkette (ribosome-nascent chain complex ; RNC) einen Mechanismus darstellt, der die Biogenese hydrophober bakterieller Proteine sicherstellt. Ein "Entlassen" des Proteins in die cytoplasmatische Umgebung würde mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Bildung von Proteinaggregaten im Cytoplasma führen (Bernstein, 1998). Das Protein könnte theoretisch zwar noch die Kompetenz für einen spontanen Einbau in die Membran besitzen, da aber die Hydrophobizität und damit auch die Aggregationsgefahr in der wässrigen Umgebung erhöht sind, wird es am RNC von SRP abgefangen und zur Translokationsapparat gesteuert. Da es sich auch bei Lhcb1 um ein Membranprotein handelt, das *in vivo* von SRP abhängig ist, um in der wässrigen Umgebung des Stromas nicht zu aggregieren, ist die Beteiligung eines Translokationskomplexes sehr wahrscheinlich. Die Problematik der Lhcb1-Aggregation wird in einem gesonderten Kapitel (siehe 4.4) diskutiert.

4.3.1 Lhcb1 inseriert in Form einer Schleifen-Struktur in Thylakoide

Am C-Terminus von Lhcb1 mit Ni^{2+} -komplexierter "His-Tag" hemmte den Translokations-Prozeß, während die Markierung von Domänen, die im stabil inserierten Protein auf der stromalen Seite lokalisiert sind, einen weniger ausgeprägten hemmenden Effekt hatten (Kapitel 3.4). Andere Untersuchungen stützen diese Beobachtung: Wenn rekombinantes Lhcb1, das entweder N- oder C-terminal mit "Green-Fluorescent-Protetin" (GFP) fusioniert und in einer Insertionsreaktion eingesetzt wurde, zeigte die Analyse der Insertionsprodukte, daß C-terminal GFP-fusioniertes Lhcb1 nicht in isolierte Thylakoide inseriert hatte, während N-terminal GFP-fusioniertes Lhcb1 als stabil inseriertes Produkt nachgewiesen werden konnte (Geiger, Diplomarbeit, 1998). Der differentielle Hemmeffekt hängt sehr wahrscheinlich mit der Topologie der Lhcb1-Translokation zusammen. Vergleicht man die endgültigen Orientierungen aller Lhcb1-Markierungen in einem assemblierten LHCII (Abbildung 3.1-1), so kann man feststellen, daß der C-Terminus die Membran theoretisch nur einmal vollständig passieren muß, um seine endgültige Orientierung in der Membran einzunehmen. Ist der C-Terminus zusätzlich markiert, müßte auch die Markierung (GFP bzw. komplexierter "His-Tag") über die Membran transportiert werden. Genau dieser Übergang scheint jedoch der hemmende Schritt bei der Translokation zu sein. Bezieht man in diese Überlegung die Ergebnisse der Insertionsversuche mit markierten Lhcb1-Domänen ein, die im funktionellen LHCII Stroma-seitig sitzen, so ist vorstellbar, daß der N-Terminus und auch die stromale Schleife die Membran während der Insertion des Proteins nicht passieren, denn die Insertions-Hemmung durch diese Markierungen war deutlich schwächer ausgeprägt. Wenn der C-Terminus die Membran passiert, alle anderen markierten Domänen jedoch nicht, ist die Konsequenz daraus, daß das Protein per "Schleifen-Mechanismus" in die Membran inseriert wird.

Ein "Einfädeln" des Proteins vom N-Terminus aus hätte zur Konsequenz, daß der N-Terminus die Membran zweimal passieren müßte, um die endgültige Position im LHCII einnehmen zu können. Ein "Einfädeln" des Proteins vom C-Terminus aus würde erfordern, daß der C-Terminus seine relative Position in der Membran dreimal, und der 2. TMH seine Position zweimal ändern müßte. Folglich müßte auch die stromale Schleife die Membran zweimal passieren. Ein stark hemmender Effekt, wie er bei den C-terminal markierten Lhcb1-Derivaten gefunden wurde, wurde bei keinem der anderen Lhcb1-Mutanten gefunden. Zwar hatte der im stromalen Loop markierte Klon D7AH2 eine Zwischenstellung in der Insertionseffizienz eingenommen, jedoch ist anzumerken, daß dieser Klon schon in den Rekonstitutionsexperimenten instabilere Komplexe bildete (siehe auch Kapitel 3.2 und 4.2). Die Komplexinstabilität selbst könnte die Ursache dafür sein, daß im Vergleich zu den anderen, Stroma-seitig markierten Klonen, etwas weniger stabil inseriertes Protein in den Thylakoiden gefunden wurde.

Hinweise dafür, daß auch die C-terminal markierten Proteine schon in ihrer Fähigkeit eingeschränkt waren, stabile Pigment-Protein Komplexe auszubilden, gab es dagegen nicht. Selbst C-terminal GFP-fusioniertes Lhcb1 bildete in Detergens-Mizellen LHCII und C3.2h mit "His-Tag" am C-Terminus konnte *in vitro* noch in Anwesenheit hoher Ni^{2+} -Konzentrationen zu LHCII rekonstituiert werden (siehe auch Kapitel 3.2 und 4.2). Die Komplexausbeuten waren dabei mit den anderen "His-Tag"-Lhcb1 vergleichbar. Die Mutante C3.2h eignete sich außerdem dazu, trimere LHCII auf einer Ni^{2+} -Säule zu rekonstituieren. (Rogl *et al.*, 1998). Selbst wenn Mutationen in C3.2h eingeführt wurden, die sich direkt auf die Pigment-bindenden Eigenschaften dieses Proteins auswirkten, konnten alle Lhcb1-Derivate monomeren LHCII und 2/3 der Derivate noch trimere LHCII bilden (Rogl *et al.*, 1999).

Der Transport von Proteinen mittels Schleifen- oder Loop-Mechanismus ist bereits in der Literatur beschrieben. Die meisten Untersuchungen beziehen sich auf bakterielle Export-Proteine (Mothes *et al.*, 1994; Kuhn *et al.*, 1994). Aber auch bei Proteinen die über die Thylakoidmembran transportiert werden, wurde solch ein Schleifen-Mechanismus postuliert. Das via ΔpH -Weg transportierte Protein pOE17 (17 kDa-Untereinheit des OEC) wurde in das Thylakoidlumen exportiert, während das N-proximal der LTD fusionierte mature mOE23 (23 kDa UE des OEC, ebenfalls ΔpH -abhängig) mitsamt Signalpeptid auf der stromalen Seite verblieb (Fincher *et al.*, 1998). Transport-Zwischenprodukte mit Schleifen-Charakteristik konnten bei spontan in die Thylakoidmembran inserierenden Proteinen (PSII W, PsbY) gefunden werden (Thompson *et al.*, 1998). Die Zielsteuerung der integralen Thylakoid-Proteine erfolgt mit einer spaltbaren Bipartite-Signalsequenz, wie sie für die Sec- oder ΔpH -abhängig transportierten Proteinen charakteristisch ist (Siehe Einleitung, Kapitel 1.2.2.1, Kim *et al.*, 1998; Thompson *et al.*, 1998 a). Mutationen in der TPP-Schnittstelle führte in beiden Fällen zur Akkumulation der Schleifen-Zwischenprodukte.

Der SRP-abhängige Proteinexport, sowohl in Bakterien als auch in das eR, ist mit einem co-translationalen Transport gekoppelt. Die SRP-abhängige Insertion thylakoidaler Proteine erfolgt wahrscheinlich sowohl co-, als auch posttranslational. So wird kerncodiertes Lhcb1 im Cytosol translatiert und zunächst in den Plastiden importiert, bevor das Protein in die Thylakoidmembran eingebaut wird. Dagegen könnte Plastiden-codiertes D1-Protein, das mit cpSRP54 zu interagieren scheint cotranslational transportiert werden (Nilsson *et al.*, 1999). Dafür spricht, daß cpSRP54 wiederum mit den 70S Ribosomen der Plastiden wechselwirkt (Franklin und Hoffman, 1993; Schuenemann *et al.*, 1998). Nur wenn die Integration posttranslational stattfindet, d.h., das Protein bereits vollständig synthetisiert ist, kann sie per Loop-Mechanismus erfolgen. Da der SRP-abhängige, posttranslationale Transport jedoch bisher nur bei Lhcb1 ausgiebig untersucht wurde, ist es nicht ungewöhnlich, daß dieser Mechanismus bisher nicht bei anderen Proteinen gefunden wurde, die SRP-abhängig transportiert werden.

Eine weitere Ursache für die ineffektive Insertion C-terminal markierter Proteine könnte die Wechselwirkung des C-Terminus mit der Translokations-Maschinerie sein. Dagegen sprechen jedoch Experimente mit Lhcb1-Derivaten, die auch dann noch in isolierte Thylakoide inseriert wurden, wenn sie C-terminal um bis zu 13 Aminosäuren verkürzt vorlagen (Kuttkat *et al.*, 1995; Kuttkat *et al.*, 1996).

4.3.2 Ein "His-Tag" am C-Terminus von Lhcb1 setzt die Insertions-Effizienz herab

Für Untersuchungen zur Topographie von Lhcb1 während der Membraninsertionen wurden Lhcb1-Derivate hergestellt, die "His-Tags" an verschiedenen Positionen des Proteins tragen (vgl. Abbildung 3.1-1). Daß "His-Tags" im Lhcb1 die funktionelle Struktur durch die kaum beeinflussen, wurde bereits in Kapitel 4.2 diskutiert. Bei den Insertionsexperimenten sollte sich zeigen, ob "His-Tags" effizient durch die Thylakoidmembran transportiert werden.

In der Literatur findet man, daß "His-Tag"-Proteine, die via Zielsteuerungsmechanismus in oder durch Membranen transportiert wurden, durch diese Markierung in ihrer Transportkompetenz nicht beeinflußt wurden (Rothen *et al.*, 1996, Yoshihisa und Ito 1996). Wenn aber der "His-Tag" mit Metallionen komplexiert vorlag wurde der Transport dieser Proteine über die ChloroplastenHüllmembranen (Rothen *et al.*, 1996) oder die Plasmamembran von *E.coli* (Yoshihisa und Ito 96) sehr wohl gehemmt oder vollständig inhibiert. Das *E.coli* Membranprotein pro-OmpA, das in die äußere Membran exportiert wird, wurde in Anwesenheit von 120 μM Ni^{2+} in Plasmamembran-Vesikeln arretiert, wenn der "His-Tag" in der N-terminalen Translokations-Initiations-Domäne des Proteins lag und die Zugabe von Ni^{2+} zu einem frühen (Initiations-) Zeitpunkt erfolgt war (Yoshihisa und Ito, 1996). Wie ein solcher "His-Tag"- Ni^{2+} Komplex die Translokation hemmt, wurde nicht aufgeklärt. Vorstellbar wäre, daß die Translokation durch die Komplexbildung mit Ni^{2+} sterisch unmöglich wird, weil ein Teil des Proteins durch die Komplexbildung eine starre Konformation einnimmt. Eine sterische Behinderung der Translokation wurde bei mitochondrialen Proteinen vermutet, die mit Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) fusioniert und mit Methotrexat komplexiert vorlagen. Solche komplexierten Fusionsproteine konnten nicht mehr in die Organellen importiert werden (Eilers und Schatz, 1986). Andererseits könnte der Transport-hemmende Effekt durch die zusätzlichen positiven Ladungen, die das Protein durch die Ni^{2+} -Komplexbildung erhält, auch rein energetisch bedingt sein.

Mit Metallionen komplexierte "His-Tag"-Proteine scheinen, zumindest beim Import in die Chloroplasten, die Translokation von Proteinen effektiver zu hemmen, als DHFR-Methotrexat Komplexe (America und Hagemann, 1994) oder Proteine, die an Antikörper gebunden wurden (Schnell und Blobel, 1993). Eine mögliche Ursache ist die höhere Komplexstabilität des "His-Tag"- Ni^{2+} Komplexes im Vergleich zum DHFR-Methotrexat Komplex (Rothen und Thiess, 1997). Vorstellbar wäre auch, daß die zur Translokation notwendige Entfaltung des Proteinkomplexes durch die Chaperone der Chloroplasten-Import-Pore (Hsp70) mit einem "His-Tag"- Ni^{2+} -Komplex inhibiert wird, wogegen die Entfaltung von DHFR-Methotrexat Komplexen nicht eingeschränkt ist.

Zur Hemmung der Translokation rekombinanter Proteine in oder über die Thylakoidmembran gibt es wenig Daten. Die Untersuchungen beschränken sich zudem auf die Hemmung des ΔpH - oder Sec-abhängigen Transportwegs: Proteine des thylakoidalen oder bakteriellen Sec-Transportsystems wurden in ihrem Transport gehemmt, wenn sie DHFR-fusioniert und mit Methotrexat oder Aminopterin komplexiert vorlagen. (Pugsley, 1993, Endo *et al.*, 1994, Hynds *et al.*, 1998). Nur für den ΔpH -abhängigen Translokations-Mechanismus konnte bisher gezeigt werden, daß er gefaltetes Protein über die Membran transportieren kann. Ein kleines gefaltetes Protein (Rinder-Pankreas-Trypsin-Inhibitor), das mit der 17kDa Untereinheit des Wasser-spaltenden Komplexes (Oxygen-Evolving-Complex bzw. Oxygen-Enhancing-Complex / OEC) fusioniert vorlag, wurde über diesen ΔpH -Weg in das Lumen transportiert (Clark und Theg, 1997). Auch ein wesentlich größeres Fusionsprotein, das zudem noch komplexiert vorlag (DHFR-Methotrexat-23kDa-OEC) konnte gefaltet über die Thylakoidmembran transportiert werden. Sogar Komplexe, die mit Hilfe von eingebauten Aminosäureanaloge eine "falsche" Konformation einnahmen, wurden noch über die Membran transportiert (Hynds *et al.*, 1998).

Zieht man in Betracht, daß ein mit Ni^{2+} komplexierter "His-Tag" den Import in den Plastiden effizienter hemmt als ein DHFR-Methotrexat Komplex, kann vermutet werden, daß der "His-Tag" auch die Lhcb1 Insertion in die Thylakoide zu hemmen vermag, auch wenn dieses Protein über einen anderen Mechanismus transportiert wird (SRP-Weg).

Bei den Insertionsexperimenten zeigte sich, daß nur C-terminal markierte Lhcb1-Derivate (C3.2h und C2.4h) im Vergleich zum Wildtyp-Protein sowie zu den weiteren Hexahistidyl-markierten Lhcb1-Derivaten nicht effizient inserierten (Kapitel 3.4 Abbildung 3.4-1). Der hemmende Effekt bei Hexahistidyl-markiertem Lhcb1 war am stärksten, wenn das Protein mit Ni^{2+} komplexiert wurde (Kapitel 3.4, Abbildung 3.4-4). Schon bei sehr geringen Ni^{2+} -Konzentrationen, wurde die Insertion des C-terminal markierten Proteins C3.2h vollständig gehemmt. Das Protein aggregierte und wurde nicht stabil in die Membran eingebaut. Im Gegensatz dazu zeigten die Experimente mit N-terminal, N-proximal und im stromalen Loop markierten Lhcb1-Derivaten (44C.3, D7PH11 und D7AH2) immer eine im Vergleich zum Wildtyp-Protein noch relativ hohe Insertionseffizienz. Die Komplexierung mit Ni^{2+} wurde bei 44C.3, das am äußeren N-Terminus des Signalpeptids markiert war, erst mit 1000 μM Ni^{2+} im Reaktionsansatz inhibiert. D7PH11, das N-proximal, vor dem ersten TMH markiert war, sowie D7AH2, mit "His-Tag"-Markierung in der stromalen Schleife, konnten noch bis 100 μM Ni^{2+} stabil in die Membran inserieren. Erst bei höheren Ni^{2+} -Konzentrationen, aggregierten diese Proteine so stark, daß stabil inserierte Proteine nicht mehr nachweisbar waren. Die Hexahistidyl-Markierung am C-Terminus hatte also den größten Effekt auf die Translokations-Hemmung.

Versuche mit einem anderen Lhcb1-Derivat stützen die Vermutung, daß der C-Terminus bei der Translokation von allen untersuchten Protein-Domänen am anfälligsten auf Veränderungen im Protein reagiert: Rekombinantes Lhcb1 wurde entweder N- oder C-terminal mit "Green-Fluorescent-Protetin" (GFP) fusioniert und in einer Insertionsreaktion eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, daß C-terminal GFP-fusioniertes Lhcb1 nicht in isolierte Thylakoide inseriert

hatte, während N-terminal GFP-fusioniertes Lhcb1 als stabil inseriertes Produkt nachgewiesen werden konnte (Geiger, Diplomarbeit, 1998). Daß andererseits C-proximal, an Cystein²²⁹ biotinyliertes Protein (pLhcb1-Klon C80S/V229C), stabil in isolierte Thylakoide inserierte (Kuttkat, Dissertation 1997) hatte wahrscheinlich andere Gründe. Die Biotinylierung ist zum einen nicht annähernd so groß wie eine Fusion mit GFP, zum anderen verleiht die Markierung dem Protein an dieser Stelle auch keine positiven Ladungen, wie es bei Ni²⁺-komplexiertem "His-Tag"-Lhcb1 der Fall ist. Daher ist die Markierung wahrscheinlich mit der nicht komplexierten Variante des "His-Tags"- am C-Terminus vergleichbar, mit der ein Einbau des Proteins in die Thylakoide noch möglich war.

4.3.3 Eine N-terminaler "His-Tag" am Lhcb1 stört nicht die Thylakoidinsertion

Um zu zeigen, daß C-terminal "His-Tag"-markiertes Lhcb1 die Insertion hemmt, während die Markierung an allen anderen Positionen nicht stört, mußte der Nachweis erbracht werden, daß der N-terminal markierte pLhcb1-Klon 44C.3 als Precursorprotein inseriert wird. Nur so kann ausgeschlossen werden, daß eine mit der Entfernung des "His-Tags" gekoppelte Maturation des Proteins vor der Insertion, die hohe Insertionseffizienz hervorgerufen hatte.

In Kapitel 3.4, Abbildung 3.4-7 konnte gezeigt werden, daß das Migrationsverhalten von inserierten Trimeren unterschiedlich war, wenn die N-Termini der inserierten Proteine unterschiedlich groß waren. So migrierten Protease-unbehandelte N-terminal "His-Tag"-markierte pLhcb1-Trimere (Klon 44C.3) am langsamsten, gefolgt von pLhcb1- und schließlich von Lhcb1-Trimeren. Aufgrund dieses unterschiedlichen Migrationsverhaltens der Trimere, kann behauptet werden, daß das Signalpeptid nach der Insertion noch am Protein verblieben war. Diese Aussage konnte für Monomere nicht gemacht werden, da im unbehandelten Ansatz noch freies, unkomplexiertes Protein in der Probe vorhanden war. Dieses unterscheidet sich im Laufverhalten, zumindest bei Lhcb1, kaum von den Pigment-Protein Komplexen. Zusätzlich wurde die Interpretation der Insertionsprodukte auf Migrationshöhe der Monomere dadurch erschwert, daß bei beiden pLhcb1-Klonen mindestens ein drittes radioaktives Signal auftrat. Bei dieser weiteren Bande handelte es sich wahrscheinlich um Protein, das durch die Stroma-Peptidase (SPP) verkürzt wurde. Es wurde nicht weiter festgestellt, ob dieses Protein frei oder komplexiert vorlag.

Während in der Literatur einerseits beschrieben wurde, daß pLhcb1 teilweise mit dem Signalpeptid inseriert werden kann (Cline, 1986 (Import und Insertion); Cline *et al.*, 1989 (Import und Insertion), Yuan *et al.*, 1993 (Import und Insertion)), fand man andererseits bei anderen Importexperimenten eine schnelle Degradation des Precursor-Proteins zum murenen Lhcb1 (Reed *et al.*, 1990). Die Daten sprechen dafür, daß die SPP das Signalpeptid sowohl vor, als auch nach der Insertion proteolytisch angreifen kann. Die Ursache der unterschiedlichen Resultate könnten in etwas anderen experimentellen Bedingungen der Import- bzw. Insertionsreaktionen gelegen haben. Sowohl das Alter der Chloroplasten, als auch der Erntezeitpunkt nach der Licht-/ bzw. Dunkelphase kann Enzymaktivitäten beeinflussen. So könnte auch die SPP-Aktivität unter verschiedenen Bedingungen unterschiedlich gewesen sein.

Hier jedenfalls kann eindeutig festgehalten werden, daß unmaturiertes pLhcb1 stabil in die Thylakoide integriert wurde. Unterstützt wird dies durch Experimente mit N-terminal GFP-fusioniertem Lhcb1 (Geiger, Diplomarbeit, 1999). Hier war keine Degradation des Proteins durch die SPP zu erwarten, da das Fusionsprotein ohne Signalpeptid kloniert wurde. Dieses Lhcb1-Derivat konnte mitsamt GFP effektiv in isolierte Thylakoide inserieren und sowohl LHCII-Monomere als auch LHCII-Trimere bilden. Die N-terminale Verlängerung des Proteins hemmte die Insertion im Gegensatz zum C-terminal GFP-fusionierten Protein nicht (vergleiche auch Kapitel 4.3.2). Ein weiterer Indikator dafür, daß die Effizienz der 44C.3-Insertion nicht durch die Entfernung des His-Tags verursacht wurde ist, daß auch das N-proximal Histidin-

markierte Lhcb1-Derivat D7PH11, das keine Schnittstelle für die PS trägt sehr effizient inserierte, wenn auch nur in monomerer Form.

4.3.4 Der Elektronenakzeptor Methylviologen kann das Insertionssystem nicht stabilisieren

Mit dem Versuch, das Insertionssystem auf den im Licht ablaufenden Elektronentransport hin zu stabilisieren und einen hohen ΔpH über der Thylakoidmembran zur Regeneration von ATP zu gewährleisten, wurde Methylviologen (MV), ein Elektronenakzeptor für PSI, eingesetzt (Kapitel 3.4, Abbildung 3.4-6). Damit sollte überprüft werden, ob die Insertionsdauer noch erhöht werden könnte, um schlechter inserierendes Protein (C3.2h) besser nachweisen zu können. Das System wurde jedoch durch MV destabilisiert und die Insertion von Lhcb1 gehemmt. Dies lag wahrscheinlich daran, daß die Thylakoide über einen relativ langen Zeitraum mit MV inkubiert wurden und damit einem hohen oxidativen Streß ausgesetzt waren. Reduziertes MV ist ein guter Elektronendonator für O_2 , was bedeutet, daß die Mehler-Reaktion durch MV forciert wurde. Eine Reduktion von molekularem Sauerstoff resultiert in der Bildung von H_2O_2 und, bei weiterem Elektronenfluß, in der Bildung von Hydroxylradikalen. Die damit verbundenen photooxidativen Prozesse (Wirkung auf Lipide, Proteine, Chlorophylle usw.) wären dann die Erklärung für diese destabilisierende Wirkung von MV auf die Insertion. Eventuell hätte die Zugabe von Katalase das System besser stabilisieren können, denn dann hätte Sauerstoff als Elektronenakzeptor wieder zur Verfügung gestanden.

4.4 "His-Tag"-Lhcb1 im Chloroplastenstroma neigt zur Aggregation

Lhcb1 ist ein Membranprotein, das im wässrigen Milieu aggregiert. Wird das Protein in Bakterien überexprimiert, akkumuliert es in Form unlöslicher Einschlusskörper in den Bakterienzellen. Das Protein kann nur mittels Detergens oder mit 8M Harnstoff in Lösung gebracht werden. Die Löslichkeit für das Wildtyp-Protein beträgt in 8 M Harnstoff etwa 0,35 µg/µl. Lhcb1 mit "His-Tag" ist dagegen weniger gut in Harnstoff löslich (0,15-0,2 µg/µl). Wenn das Protein in der Pflanzenzelle während des Transports vom Cytosol in die Thylakoide nicht in Lösung gehalten würde bestünde, auch hier die Gefahr, daß das Protein im wässrigen Milieu irreversibel ausfällt. Dies würde letztlich die Biogenese der Lichtsammelproteine gefährden. Dies wird in der Pflanzenzelle dadurch verhindert, daß das Protein während der Zielsteuerung mit Chaperon des Chloroplasten (Hsp70; cpSRP) einen löslichen Transitkomplex bildet.

Für Insertionsexperimente, die am letzten Schritt der Lhcb1-Translokation einsetzen, nämlich nach dem Import des Proteins in das Chloroplastenstroma, wird das rekombinante Lhcb1 zunächst in 8 M Harnstoff entfaltet. Wird diese Lösung zum Reaktionsansatz gegeben, kommt es zur Verdünnung des Harnstoffs auf 160 µM, d.h. damit Proteine nicht aggregieren, müssen sie sofort von cpSRP, übernommen werden. Lhcb1-Derivate mit "His-Tag" lösten sich nicht nur in Harnstoff schlechter, sondern sie aggregierten auch im Reaktionsansatz der Insertionsexperimente deutlich schneller als das Wildtyp-Lhcb1. Nicht inseriertes Protein wurde trotz Waschen der Thylakoide und anschließender Thermolysin-Behandlung nicht, bzw. nicht vollständig verdaut. Da die Thermolysin-Resistenz bisher als Kriterium stabil inserierten Proteins galt, mußte bewiesen werden, daß es sich bei den gefundenen Abbauprodukten der "His-Tag"-Proteine tatsächlich um Proteinaggregate handelte, die nicht in isolierte Thylakoide inseriert waren. Das typische Bandenmuster nicht inserierter "His-Tag"-Derivate wurde auch bei solchen Kontrollversuchen gefunden, die Insertionsbedingungen so gewählt waren, daß Lhcb1 prinzipiell nicht inserieren kann. Dazu wurden dem Reaktionsansatz entweder keine Thylakoide zugegeben, oder es wurde kein Stromaextrakt zugefügt, womit die Chaperone fehlten. In einem dritten Versuch wurden keine NTPs zugegeben, bzw. eventuell noch vorhandene NTPs durch Apyrasezugabe hydrolysiert (Kapitel 3.4 Abbildung 3.4-2 und 3.4-4). Die Dissoziation des Transitkomplexes an der Thylakoidmembran (bestehend aus cpSRP43/54 und Lhcb1) soll der NTP- bzw. GTP-hydrolysierende Schritt bei der Insertion sein. Da Chaperone des Stromaextrakts, NTPs sowie Membranen für die Insertion absolut notwendig sind, konnte es sich bei den gefundenen Abbau-Banden also nicht um inseriertes Protein handeln. Auch die Möglichkeit, daß das Protein erst in der Membran aggregierte wurde mit den Kontrollexperimenten ausgeschlossen.

4.4.1 Die Hemmung der Insertion durch Octylglycosid

Da durch die Aggregation der "His-Tag"-Proteine nicht wünschenswert war, wurde versucht, die Löslichkeit des Proteins in Harnstoff durch Detergens-Zugabe zu verbessern. Aufgrund eines Vorversuches zeigte sich, daß Lhcb1-Derivate sich in 8M Harnstoff besser lösen, wenn zusätzlich 1% Octylglycosid in der Lösung vorhanden war (ohne Abbildung). Daraufhin wurde Lhcb1 vor dem Insertionsexperiment in 8M Harnstoff / 1% OG gelöst. Diese Lösung wurde im Reaktionsansatz 1:50 verdünnt. Damit wurde die kritische mizelläre Konzentration (CMC) von OG (0,7 %) unterschritten. Dies sollte vermeiden, daß für die Insertion wichtige Proteine des Stromas und der Thylakoide solubilisiert werden.

Es wurde beobachtet, daß 0,02% (OG) im Insertionsansatz die Insertion von Lhcb1 in isolierte Thylakoide hemmte (Kapitel 3.4, Abbildung 3.4-3), obwohl die Konzentration nach Verdünnung weit unterhalb der CMC lag. Die Hemmung der Insertion könnte dadurch verursacht worden sein, daß OG zwar keine Mizellen mit Lhcb1 bildete, OG jedoch eine Affinität für Lhcb1 besaß, die um die Bindung mit den stromalen Chaperonen (cpSRP) konkurrierte und schließlich doch zur Aggregation des Proteins führte. Die schlechte Insertions-Effizienz war nicht "His-Tag"-spezifisch, denn auch Wildtyp-Lhcb1 wurde unter diesen Bedingungen schlechter in die Membranen inseriert. Da die zusätzliche Verwendung von Detergentien nicht den gewünschten Erfolg brachte, wurde das Protein weiterhin in 8M Harnstoff gelöst.

4.4.2 Metallionen führen zur Aggregation von "His-Tag"-Lhcb1

"His-Tag"-Lhcb1 konnte zunächst mit dem ursprünglich von Kuttkat, Dissertation, 1997 etablierten Insertionsansatz nicht inseriert werden. Hier lag die Magnesiumkonzentration des Ansatzes bei 25 mM Mg^{2+} , wobei der interne Mg^{2+} -Gehalt des Stromas und der Thylakoide nicht mit eingerechnet wurde. Dieser kann etwa noch einmal etwa 2 mM ausmachen (Zur Berechnung wurden Literaturangaben auf die in einem Insertionsansatz verwendeten Stroma- und Thylakoidmengen bezogen; Nakatani *et al.*, 1979). Es wurde vermutet, daß die hohe Mg^{2+} -Konzentration das "His-Tag"-Protein so komplexiert hatte, daß eine Wechselwirkung mit cpSRP nicht mehr möglich war, so daß es schließlich zur Aggregation der Lhcb1-Derivate kam. Alle verwendeten Puffer wurden daraufhin so verändert, daß nur noch 10 bis maximal 15 mM Mg^{2+} im Reaktionsansatz vorhanden war. Fortan konnten neben Wildtyp-Lhcb1 auch die "His-Tag"-Proteine inseriert werden (Kapitel 3.4, Abbildung 3.4-1).

Es stellte sich die Frage, ob die Hemmung der Insertion durch die Zugabe kompetitiver Metall-bindender Agentien (L-Histidin, EDTA) zum (Metall-haltigen) Insertionsansatz zumindest zum Teil wieder aufgehoben werden kann. Wie bereits in Kapitel 4.1 beschrieben, spielen Ionen für die physiologischen und strukturellen Eigenschaften der Chloroplasten eine wichtige Rolle. Auch für die Insertion selbst ist Mg^{2+} notwendig (Cline, 1986, Chitnis *et al.*, 1987). In Kapitel 3.4 (Abbildungen 3.4-2 und 3.4-5) wurde gezeigt, daß die Zugabe von 200 μ M EDTA oder 5 mM L-Histidin die Insertion von Lhcb1 hemmte, wobei Histidin einen größeren Effekt auf die "His-Tag"-Lhcb1 Insertion hatte. Wahrscheinlich hatten EDTA und L-Histidin Ionen-abhängige Prozesse gestört, möglicherweise auch solche, die mit der Protein-Translokation nur indirekt im Zusammenhang stehen ("stacking", ATP-Synthese im Licht

usw.), jedoch die Eigenschaften der Thylakoide so veränderten, daß Lhcb1 nicht mehr stabil inseriert werden konnte. Warum L-Histidin einen stärkeren Effekt auf die Hexahistidyl-markierten Proteine hatte, blieb jedoch unklar. Da Wildtyp-Lhcb1 die Insertions-Fähigkeit auch in Anwesenheit hoher Metallionenkonzentration nicht verloren hatte, beruhte der Insertions-hemmende Effekt bei den "His-Tag"-Derivaten mit hoher Wahrscheinlichkeit auf der Komplexbildung zwischen His-Tags und Metallionen. Diese Komplexe waren nicht mehr in der Lage mit Hilfe von SRP im Stroma in lösliche Form gebracht zu werden und bildeten infolgedessen Aggregate.

Die Ergebnisse, daß einerseits hohe Magnesiumkonzentrationen (bei etwa 25 mM Mg^{2+}) zur Aggregation aller "His-Tag"-Derivate führte, andererseits aber die verschiedenen Klone zwischen 10 μ M und 1 mM Ni^{2+} einen differentiellen Effekt, je nach Position des "His-Tags" im Protein, zeigten, widersprechen sich nicht. Vorstellbar wäre, daß die positionsabhängige Hemmung (Nickel-Versuche, Kapitel 3.4, Abbildung 3.4-4) mit der Translokation des Nickelkomplexes über die Membran zusammenhängt, während die totale Hemmung der Insertion durch hohe Mg^{2+} - (25 mM), bzw. Ni^{2+} -Konzentrationen (100-1000 μ M) mit der Löslichkeit des Proteins im Stroma, d.h. der Bindung an cpSRP gekoppelt ist. Das Lösen des Proteins schien ungeachtet der "His-Tag"-Position, bei höheren Metallionenkonzentrationen nicht mehr möglich zu sein, was dann zu einer vollständigen Aggregation der Proteine führte. Daß die Hemmung "His-Tag"-spezifisch gewesen sein mußte, wurde anhand der Kontrollexperimente mit Wildtyp-Lhcb1 gezeigt. Dieses konnte sowohl mit höheren Mg^{2+} -Konzentrationen, als auch mit bis zu 1 mM Ni^{2+} noch stabil inseriert werden. Mg^{2+} hat eine geringere Affinität zu Histidin-Resten, als Nickel (Dawson, Data for Biochemical research, 3. Auflage), was erklären würde, daß eine vollständige Hemmung durch Mg^{2+} erst bei etwa 200-facher Konzentration, im Vergleich zu der für Ni^{2+} gezeigten Konzentration, erfolgt.

4.5 Mutationen an bestimmten Positionen im Lhcb1 hemmen die Trimerisierung

4.5.1 Ein "His-Tag" N-proximal der ersten TMH hemmt die Trimerisierung von LHCII

D7PH11 ist eine Lhcb1-Mutante mit einem "His-Tag" N-proximal der ersten transmembranen α -Helix (TMH) zwischen Position Alanin⁵³ und Aspartat⁵⁴. Das Protein konnte *in vitro* zum monomeren LHCII rekonstituiert werden und inserierte stabil in isolierte Thylakoide (Kapitel 3.2 und 3.4). Die Insertionseffizienz der integrierten Monomere war stets sehr hoch und mit der des Wildtyp-Proteins vergleichbar (siehe z.B. Abbildung 3.4-1 und 3.4-2). Dieses Lhcb1-Derivat war jedoch nicht mehr in der Lage trimeren LHCII zu bilden. Auch mit Trimerisierungsexperimenten *in vitro* wurden nur LHCII-Monomere gebildet (C. Huschenbett, unveröffentlichte Daten). In Abbildung 4.2-1 ist die Position der Hexahistidyl-Markierung hervorgehoben. Aus dieser Abbildung erkennt man die beiden den "His-Tag" flankierenden Aminosäuren im Zentrum des LHCII-Trimers. Die Hemmung der Trimerisierung beruht wahrscheinlich auch darauf, daß der dazwischen sitzende "His-Tag" soviel Raum einnimmt, daß er die Trimer-stabilisierenden Interaktionen der Untereinheiten unterbindet. Weiterhin könnte das Trimerisierungs-Motiv WYXXXR, das im Protein weiter N-terminal an Position 16-21 lokalisiert ist (Hobe *et al.*, 1995) durch die Einführung des "His-Tags" so verschoben sein, daß die Assoziation von D7PH11-Monomeren strukturell nicht mehr möglich ist.

4.5.2 Mutationen in den Chlorophyll-Liganden Histidin⁶⁸ und Glutamat¹³¹ hemmen die Trimerisierung von LHCII aus unterschiedlichen Gründen

Im Zuge dieser Doktorarbeit wurden Insertionsexperimente mit Chlorophyll-Liganden-Mutanten unternommen, um Daten, die in der Arbeitsgruppe aus *in-vitro*-Faltungen gewonnen wurden, zu erhärten und zu vervollständigen (Yang *et al.*, 1999). Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Untersuchung der Trimerisierungskompetenz dieser Mutanten (Kapitel 3.6).

Bei der Chlorophyll-Liganden-Mutante aus die an Position Histidin⁶⁸ ein Phenylalanin bzw. Leucin trägt (H68F, H68L, bzw. H68F/E65Q), gingen bei *in-vitro*-rekonstituierten Komplexen durch den Austausch des Histidins, je nach experimentellen Bedingungen, zwischen Chlorophylle, vornehmlich Chl *a*, im LHCII verloren. Gleichzeitig zeigten die Komplexe eine sehr hohe thermische Instabilität (Yang *et al.*, 1999). Die Aminosäure ist Ligand von Chl *a*5 und befindet sich im Trimer sehr nahe an den Berührungflächen der Monomere (siehe Kühlbrandt-Stuktur, Kühlbrandt *et al.*, 1994). Die Mutation, die mit einem Pigmentverlust gekoppelt ist, könnte eine strukturelle Instabilität in diesem Bereich hervorgerufen haben, die sich wiederum destabilisierend auf die Trimerisierung auswirkte. Auch bei Trimerisierungsexperimenten *in vitro* mit Mutanten, deren Histidin an Position 68 gegen Alanin ersetzt war, zeigten die Komplexe einen erhöhten Chl *a*-Verlust. Bei diesen Experimenten konnten, wenn überhaupt Trimer-Banden in einem Saccharose-Dichtegradienten erschienen, diese nur in sehr geringer Ausbeute gewonnen werden (Rogl und Kühlbrandt, 1999).

Anders verhielten sich Mutanten, die in der Position Glutamin¹³¹ verändert wurden. Hier hatte nur der Aminosäure-Austausch gegen Serin (Q131S) einen Verlust der Trimerisierungskompetenz zur Folge, wogegen der Austausch gegen Glutamat (Q131E) diese nicht beeinflusste. (Kapitel 3.6). Auch der Austausch gegen Alanin führte bei *in-vitro*-Trimerisierungen nicht zu einem Verlust der Trimerisierungsfähigkeit des Proteins (Rogl und Kühlbrandt, 1999). Wurde das Protein der Mutante Q131S in isolierte Thylakoide inseriert und wurden diese nach der Protease-Behandlung im schwach denaturierenden Gel aufgetrennt, dann erschienen dort weder LHCII-Trimere noch LHCII-Monomere, sondern nur noch unkomplexiertes Protein. Die Destabilisierung, die durch die Mutation verursacht wurde, zeigte sich auch dadurch, daß *in vitro* rekonstituierte Q131S-Monomere eine hohe thermische Instabilität aufwiesen (Yang *et al.*, 1999). Da die Pigment-Stöchiometrie durch den Austausch der Aminosäure Glutamin gegen entweder Glutamat oder Serin einen etwa gleich starken Chlorophyllverlust (vornehmlich Chl *b*) verursacht (Yang *et al.*, 1999), scheint die Trimer-destabilisierende Wirkung in Q131S weniger von der veränderten Pigment-Koordination als von einer strukturellen Störung im Komplex durch den Serin-Rest hervorgerufen worden zu sein. Da schon die Monomere keine stabilen Komplexe bildeten, war es nicht überraschend, daß diese Mutante nicht trimerisierte.

4.6 Untersuchungen zur LHCI-Biogenese

Die Biogenese pflanzlicher Lichtsammelproteine mit Hilfe von Insertionsexperimenten wurde bisher hauptsächlich mit Lhcb1, dem majoren Lichtsammelprotein der PSII-Antenne (LHCII) untersucht. Diese Arbeit wurde daraufhin auch auf das bisher in dieser Hinsicht kaum charakterisierte Protein Lhca1 erweitert, das in einer der beiden PSI-Antennen (LHCI-730) gefunden wird. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen sind in Kapitel 3.5 dargestellt.

4.6.1 LHCI-730 in Thylakoiden wird von Thermolysin nicht degradiert

Es wurde untersucht, ob stabil in Thylakoide eingebaute Lhca1,4 gegenüber Thermolysin-Behandlung resistent sind, um auch für die Insertionsexperimente mit rekombinantem Lhca1 einen Nachweis stabil inserierter Proteine zu haben. Thermolysin hydrolysiert Peptidbindungen N-terminal von Valin, Leucin, Isoleucin und Phenylalanin. Durch eine Thermolysin-Behandlung wird LHCII in Erbsenthylakoiden N-terminal verkürzt (Kuttkat *et al.*, 1995). Unabhängig davon, ob LHCI in Thylakoiden in monomerer, in dimerer Form oder an PSI assembliert vorlag, blieb es vollständig Protease-geschützt, obwohl in Lhca1 und Lhca4 vergleichbare Thermolysin-Schnittstellen vorhanden wären (Abbildung 4.10-1; Aminosäuren Glycin⁵⁰ und Leucin⁵¹ in Lhcb1; Kapitel 3.5, Abbildung 3.5-1).

1

68

RKSATTKKVASSGSPWYGPDVKYLGPFSGESPSYLTGEFPGDYGWDTAGLSADPETFSKNRELEVIH Lhcb1, E.
 SADwMpgQPR**p**Sy1dgs**A**pg**D**F**G**fdp**l**g**l**GeVpAnlERYKESe**L**I**H** Lhca1, T.
 KKGQwLpgLASpDyldgsLpgGNDfdp**l**g**l**VeDpEnlKWFIQAeLVN Lhca4, T.

Abbildung 4.6.1-1 Vergleich der N-Termini von Lhcb1, Lhca1 und Lhca4. Fette Buchstaben zeigen die Sequenzhomologie zwischen Lhca1, bzw. Lhca4 und Lhcb1, Kleine Buchstaben unterlegen die Homologie zwischen Lhca1 und Lhca4. Die unterstrichenen Aminosäuren stellen die beiden, vom Oligomerisierungszustand von LHCII abhängigen, Thermolysin-Schnittstellen (DP und DP*) in Thylakoiden dar. 1-68 bezieht sich auf die Aminosäure-Abfolge in Lhcb1. E = Erbse; T = Tomate

Die Schnittstelle wird von Thermolysin nur erkannt, wenn LHCII im Thylakoiden in monomerer Form vorliegt. Trimerer LHCII dagegen bleibt stärker geschützt und wird zwischen Valin⁹ und Alanin¹⁰ hydrolysiert. Dies wurde anhand der Insertionsexperimente aus Kapitel 3.5 Abbildung 3.5-2 und 3.5-3 festgestellt. Erst kürzlich wurde von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt, daß importiertes *Arabidopsis*-Lhca1 in Erbsenthylakoiden ebenfalls vollständig Protease-resistent bleibt (Kim *et al.*, 1999). In LHCI scheint also der N-Terminus für die Protease nicht zugänglich zu sein. Obwohl die Primärstruktur Homologien zu LHCII aufweist, könnte der Grund für die Resistenz gegenüber Thermolysin sein, daß diese Domäne an der stromalen Seite der Thylakoidmembran eine andere Konformation einnimmt.

4.6.2 Lhca1 aus Tomate wird in das Erbsensystem inseriert, in das Tomatensystem dagegen nur schlecht

Rekombinantes Lhca1 aus Tomate konnte mit Stromaextrakt aus Erbsenpflanzen in Erbsenthylakoide eingebaut werden (Kapitel 3.5, Abbildung 3.5-2 und 3.5-3). Im Gel konnte inseriertes Lhca1 anhand von Literaturdaten (Peter und Thornber, 1991; Schmid und Schäfer, 1994) monomerem und dimerem LHCI, sowie PSI zugeordnet werden. Dies ist insofern interessant, als das bei der Lhcb1-Insertion bisher unter den Standard-Gelelektrophorese Bedingungen (siehe Kapitel 2.5.3.2) im schwach denaturierenden Gel keine intakten PSII-Komplexe, und daher keine Assemblierung inserierter LHCs an ein Photosystem gezeigt werden konnte. In welchem Oligomerisierungszustand Lhca1 an das PSI assembliert, konnte nicht geklärt werden. Bereits nach 5-Minütiger Insertion wurden schwache Signale in den Banden der LHCI-Monomere und –Dimere sowie von PSI gefunden (Abbildung nicht gezeigt). Hinweise dafür, daß LHCI erst in monomerer Form vorliegt und dann an das PSI assembliert wird, lieferte die Analyse ergrünender Gerstenpflanzen (Dreyfuss und Thornber, 1994).

Die Insertion von Lhca1 alleine hatte für die Dimerisierung und die Assemblierung in PSI ausgereicht. Im Gegensatz zu LHCI-680, der sich als Homodimer entweder aus Lhca2 oder Lhca3 zusammensetzt, besteht dimerer LHCI-730 aus den beiden Apoproteinen Lhca1 und Lhca4 (Jansson *et al.*, 1996; Schmid *et al.*, 1997). Für die Assemblierung von rekombinantem Lhca1 aus Tomate in Dimere und PSI reichte demnach natives Lhca4 aus Erbsenthylakoiden aus. Je nach Insertionsexperiment traten unter gleichen Bedingungen unterschiedlich starke Dimer- und PSI-Signale auf, was aber wahrscheinlich mit der Behandlung der Membranen zusammenhing. Wurden die Membranen direkt nach der Insertion solubilisiert und auf ein Gel aufgetragen, so waren die LHCI-Signale der Dimere und die des PSI stärker, wurden die Thylakoide zunächst eingefroren, dauerte es länger, bis sie vollständig solubilisiert waren, und die Signale wurden schwächer. Einfrieren und längere Solubilisierung führten wahrscheinlich zu einem stärkeren Zerfall der Komplexe.

Bei dem Versuch, ein homologes System für das ursprünglich aus Tomate stammende Lhca1 zu etablieren (Tomatenstroma und –Thylakoide, Kapitel 3.5, Abbildung 3.5-4), wurde festgestellt, daß Tomatenpflänzchen 14 Tage länger wachsen mußten, als Erbsen, um überhaupt ausreichende Mengen an Thylakoiden und Stroma aus den Blättern isolieren zu können. Weiterhin zeigte sich, daß Tomaten-Chloroplasten sehr instabil waren, und trotz optimierter osmotischer Bedingungen stark zur Lyse neigten; d.h. vor der induzierten Lyse hatten die Chloroplasten schon Stroma verloren. Möglicherweise wurden bei der Chloroplasten-Isolation Sekundärstoffe mit angereichert, die Membran-destabilisierend wirkten. Als störende Substanzen kommen Steroid-Alkaloide vom Solanum-Typ in Frage (vor allem die Glycoalkaloide Solanin und Chaconin), die gerade in grünem Gewebe von Tomaten in hohen Mengen enthalten sind und wegen ihres amphiphilen Charakters Detergens-ähnliche Eigenschaften aufweisen könnten.

Um trotzdem das Erbsen-System mit dem Tomatensystem vergleichen zu können, wurden Stroma und Thylakoide auf gleiche Gesamt-Protein- bzw. Chlorophyll-Menge eingestellt. Es stellte sich heraus, daß Erbsenstroma zusammen mit Erbsenthylakoiden die höchsten Ausbeuten an stabil inseriertem rekombinantem Protein lieferten. Dies traf sowohl für Lhcb1 aus Erbse, als auch für Lhca1 aus Tomate zu. Erwartet wurden ähnliche Ergebnisse für das Tomatensystem. Für den Fall, daß das ehemals aus Tomate stammende Lhca1 charakteristische Eigenschaften aufweist würde, die eine Interaktion mit Tomaten-eigenem cpSRP, bzw. Thylakoidkomponenten spezifischer macht, sollte das homologe System sogar noch besser funktionieren. Das Gegenteil war jedoch der Fall. Die Komponenten aus Tomate waren jedoch weniger gut geeignet, um Lhca1 in die Membran zu integrieren. Dies entsprach nicht den Erwartungen. Zieht man in Betracht, daß die Tomatenpflanzen dreimal so alt waren, wie die Erbsenpflanzen, muß davon ausgegangen werden, daß der Verlust der Insertionskompetenz mit dem Alter der Pflanzen zusammenhängt. Im Gegensatz zu älteren Pflanzenteilen, findet in gerade ergrünenden Pflanzenteilen eine starke Chloroplastenentwicklung statt. Sämtliche Photosynthese-Komponenten müssen in kürzester Zeit aufgebaut werden. Im Versuch wurden aus solchen gerade ergrünenden Erbsen Stroma und Thylakoide isoliert. Die Tomatenpflanzen dagegen mußten länger wachsen, damit genügend Blattmaterial für die Isolation zur Verfügung stand. Möglicherweise waren diese Pflanzen in physiologischer Hinsicht zu alt und hatten nicht mehr ausreichend für die Zielsteuerung von LHC notwendige cpSRP-Faktoren. Zur Abschätzung der Qualität des isolierten Stromas wurde der Anteil an Targeting-Proteinen im Stroma nie direkt, sondern nur der Gesamt-Proteingehalt im Stroma bestimmt (2.4.4). Dieser Gehalt war für Erbsen, die immer unter gleichen Bedingungen angezogen und geerntet wurden, ein ausreichendes Kriterium.

5 Zusammenfassung

Der wichtigste Chlorophyll *a/b*-bindende Lichtsammelkomplex höherer Pflanzen ist der an Photosystem II assoziierte LHCII. Die kerncodierten Apoproteine dieses Pigment-Protein Komplexes werden posttranslational in den Chloroplasten importiert und mit Hilfe des plastidären "Signal-Recognition-Pathway" (cpSRP-Weg) durch das wäßrige Stroma transportiert. Schließlich werden die Lichtsammelproteine in die Thylakoidmembran eingebaut, mit Pigmenten beladen, oligomerisiert und an PSII assembliert. Der Mechanismus und die genaue Abfolge dieser letzten Schritte der LHCII-Biogenese sind nicht vollständig aufgeklärt. Hauptschwerpunkt der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen zur Topographie des Lichtsammelproteins Lhcb1 während der Membraninsertion.

Dazu wurden rekombinante Lichtsammelproteine (Lhcb1) in definierten Proteindomänen mit einem sechs aufeinanderfolgenden Histidinen ("His-Tag") versehen. Unter Verwendung von Expressionsvektoren, die den codierenden DNA-Abschnitt des Lichtsammelproteins trugen, wurden folgende Lhcb1-Derivate hergestellt und in Bakterien überexprimiert: C-terminal Hexahistidyl-markiertes Lhcb1 und pLhcb1, Lhcb1 mit einem "His-Tag" in der stromalen Schleifendomäne zwischen Helix A und C sowie Lhcb1 mit einer ebenfalls Stroma-seitigen Markierung N-proximal von Helix B. Für die Untersuchungen stand weiterhin ein pLhcb1-Klon mit N-terminalem "His-Tag" zur Verfügung.

Es konnte gezeigt werden, daß die Einführung eines "His-Tags" im Lhcb1 die Faltungskompetenz in keinem der hergestellten Derivate beeinträchtigt hatte. Alle mit einem "His-Tag" versehenen Proteine waren in der Lage, sich wie Wildtyp-Lhcb1 in Detergensmizellen zu Pigment-Protein Komplexen zu falten. Selbst eine Komplexierung des "His-Tags" mit Nickelionen beeinflusste die Kompetenz zur spontanen Faltung nicht wesentlich. Damit hatten alle Mutanten die wichtigste Voraussetzung für topographische Untersuchungen an der Thylakoidmembran erfüllt. Aufgrund dieser Ergebnisse bot sich jetzt die Möglichkeit, mit Hilfe eines *in-vitro*-Insertionssystems topographische Restriktionen des Thylakoideinbaus zu untersuchen.

Zunächst konnten alle Lhcb1-Derivate stabil in isolierte Thylakoide eingebaut werden. Die Komplexierung der "His-Tags" mit Ni^{2+} -Ionen zeigte dagegen einen differentiellen Effekt: Ni^{2+} in geringer Konzentration hemmte nur die Insertion des C-terminal markierten Lhcb1. Im Vergleich dazu wurde der Membraneinbau aller anderen, Stroma-seitig markierten Derivate erst in Anwesenheit hoher Ni^{2+} -Konzentrationen gehemmt. Die Schlußfolgerung aus dem Vergleich aller Insertionsversuche läßt sich wie folgt zusammenfassen: Lhcb1 wird so in die Thylakoide eingebaut, daß alle Domänen, die im gefalteten LHCII Stroma-seitig lokalisiert sind, die Membran während der Insertion nie passieren. Alle lumenalen Domänen dagegen müssen die Membran einmal überqueren. Lhcb1 nimmt demnach mit seinen drei membranständigen α -Helices während der Membran-Insertion eine Schleifenstruktur ein, wobei nur die lumenale Schleife und der C-Terminus durch die Membran transportiert werden.

Eine Histidin-Markierung hat die Besonderheit, daß sie auch als Affinitätsmarkierung verwendet werden kann. Im Zuge dessen wurden im Versuch mit Metallionen komplexierte paramagnetische Partikel auf ihre Fähigkeit getestet, "His-Tag"-Protein aus einem Proteingemisch zu isolieren. "His-Tag"-Lhcb1 konnte an diese paramagnetischen Partikel gebunden und wieder abgelöst werden. Es zeigte sich jedoch auch, daß mit "His-Tag"-Lhcb1 immobilisierte Partikel in Proteingemischen viel zu unspezifisch mit einer ganzen Reihe anderer Proteine reagierten. So mußte der Versuch aufgegeben werden, die Partikel bei einer Insertionsreaktion einzusetzen, um eine Assoziation von Lhcb1 mit dem vermuteten Membranrezeptor nachzuweisen.

Zusätzlich zum Hauptprojekt wurden auch Teilaspekte zur Biogenese einer Photosystem I-Antenne (LHCI-730) untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß Lhca1 stabil in isolierte Erbsen-Thylakoide eingebaut wird. Neben monomerem LHCI wurde dimeres und an Photosystem I assembliertes LHCI nachgewiesen. Damit gelang es zum ersten Mal der Beweis, daß *in vitro* inseriertes Lichtsammelprotein an ein Photosystem assembliert wird. Das Protein wird *in vivo* zusammen mit Lhca4 als Heterodimer isoliert. Die Insertion von Lhca1 alleine war jedoch ausreichend, um eine Oligomerisierung des Proteins in der Thylakoidmembran nachzuweisen. Im Gegensatz zu Lhcb1, das je nach Oligomerisierungszustand von LHCII eine differentielle Sensitivität gegenüber von außen zugegebenen Proteasen zeigt, bleibt Lhca1 in allen Oligomerisierungszuständen vollkommen Protease-resistent. Die Etablierung eines homologen Insertionssystems für das ursprünglich aus Tomate stammende Lhca1 ist dagegen nicht gelungen. Es konnten keine Bedingungen gefunden werden, unter denen Tomaten-Chloroplasten stabil blieben, um ausreichend konzentriertes Stromaextrakt für die Insertionsreaktion isolieren zu können. Aus einem nicht aufgeklärten Grund waren auch die isolierten Tomaten-Thylakoide für das Insertionssystem ungeeignet.

Schließlich wurden im Zuge dieser Doktorarbeit Insertionsexperimente mit Lhcb1-Mutanten unternommen, bei denen eine Chlorophyll-Ligandenposition durch eine nicht bindende Aminosäure ersetzt wurde. Die Faltungseigenschaften dieser Mutanten in der Thylakoidmembran wurden untersucht. Dabei konnte gezeigt werden daß eine Mutation, die zu einer verminderten Chlorophyll-Bindefähigkeit führte, nicht notwendigerweise den Verlust der Faltungskompetenz in der Thylakoidmembran nach sich gezogen hat. An Position Histidin⁶⁸, jedoch destabilisierten Aminosäureaustausche die Trimerisierung von Lhcb1 immer. Die Überprüfung der Aminosäureposition im LHCII-Strukturmodell macht dies plausibel: Histidin⁶⁸ ist im LHCII-Trimer ganz nah an der Berührungsfläche zwischen zwei interagierenden LHCII-Monomere lokalisiert.

- Allen, J. F., (1995), Thylakoid protein phosphorylation, state 1 state 2 transitions, and photosystem stoichiometry adjustment: Redox control at multiple levels of gene expression - Minireview, *Physiol. Plant.* 93 (1), 196-205.
- Allen, K. D. und Staehelin, L. A., (1994), Polypeptide composition, assembly and phosphorylation patterns of the photosystem II antenna system of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Planta* 194 (1), 42-54.
- America, T., Hageman, J., Guera, A., Rook, F., Archer, K., Keegstra, K., und Weisbeek, P., (1994), Methotrexate does not block import of a DHFR fusion protein into chloroplasts, *Plant Mol. Biol.* 24 (2), 283-294.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmann, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K., (1995), Short protocols in molecular biology, A compendium of methods from "Current protocols in molecular biology" 3. ed., Wiley, New York
- Bassi, R., Croce, R., Cugini, D. und Sardoná, D., (1999), Mutational analysis of a higher plant antenna protein provides identification of chromophores bound into multiple sites, *PNAS* 96 (18), 10056-10061.
- Bassi, R. und Dainese, P., (1992), A supramolecular light-harvesting complex from chloroplast photosystem-II membranes, *EJB* 204 (1), 317-326.
- Bassi, R., Sardoná, D. und Croce, R., (1997), Novel aspects of chlorophyll a/b binding proteins, *Physiol. Plant.* 100 (4), 769-779.
- Berghofer, J., Karnauchov, I., Herrmann, R. G. und Klösken, R. B., (1995), Isolation and characterization of a cDNA encoding the SecA protein from spinach chloroplasts - Evidence for azide resistance of Sec-dependent protein translocation across thylakoid membranes in spinach, *J. Biol. Chem.* 270 (31), 18341-18346.
- Bernstein, H. D., (1998), Membrane protein biogenesis: The exception explains the rules, *PNAS* 95, 14587-14589.
- Boekema, E. J., Hankamer, B., Bald, D., Kruip, J., Nield, J., Boonstra, A. F., Barber, J. und Rogner, M. (1995) Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria. *PNAS* 92, 175-179
- Boekema, E. J. van Roon H., Calkoen, F., Bassi, R. und Dekker, J. P., (1999), Multiple types of association of Photosystem II and its Light-Harvesting Antenna in partially solubilized Photosystem II membranes 38 (8), 22233-22239.
- Bogsch, E., Brink, S. und Robinson, C., (1997), Pathway specificity for a delta ph dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a sec avoidance motif in the transfer peptide and a sec incompatible mature protein, *EMBO J.* 16 (13), 3851-3859.
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzerr, M., Stueber, D., Mueller, M., Ibrahimi, I., Haeuptle M-T. und Dobberstein, B., (1987), A T5 promotor-based transcription-translation system for the analysis of proteins in vitro and in vivo 155, 416-433.
- Butler, P. J. G. und Kühlbrandt, W., (1988), Determination of the aggregate size in detergent solution of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex from chloroplast membranes, *PNAS* 85, 3797-3801.

- Cai, D., Herrmann, R. G. und Klösgen, R. B., (1993), The 20 kDa Apoprotein of the CP24 Complex of Photosystem-II - An Alternative Model to Study Import and Intra-Organellar Routing of Nuclear-Encoded Thylakoid Proteins, *Plant J.* 3 (3), 383-392.
- Caliebe, A. und Soll, J., (1999), News in chloroplast protein import., *Plant Mol. Biol.* 1999 39 (4), 641-645.
- Chaal, B. K., Mould, R. M., Barbrook, A. C., Gray J.C. und Howe C.J., (1998), Characterization of a cDNA encoding the thylakoidal processing peptidase from *Arabidopsis thaliana*, *J. Biol. Chem.* 273 (2), 689-692.
- Chaddock, A. M., Mant, A., Karnauchov, I., Brink, S., Herrmann, R. G., Klösgen, R. B. und Robinson, C., (1995), A new type of signal peptide: Central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the Delta pH-dependent thylakoidal protein translocase, *EMBO J.* 14 (12), 2715-2722.
- Chen, B. und Przybyla, A. E., (1994), An efficient site-directed mutagenesis method based on PCR, *Bio Techniques* 17, 657-659.
- Chitnis, P. R., Nechushtai, R. und Thornber, J. P., (1987), Insertion of the precursor of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein into the thylakoids requires the presence of a developmentally regulated stromal factor, *Plant Mol. Biol.* 10, 3-11.
- Clark, S. A. und Theg, S. M., (1997), A folded protein can be transported across the chloroplast envelope and thylakoid membranes, *Mol. Biol. Cell* 8 (5), 923-934.
- Cline, K., (1986), Import of proteins into chloroplasts, *J. Biol. Chem.* 261, 14804-14810.
- Cline, K., (1988), Light-Harvesting Chlorophyll a/b Protein. Membrane Insertion, Proteolytic Processing, Assembly into LHCII, and Localization to Appressed Membranes Occurs in Chloroplast Lysates, *Plant Physiol.* 86, 1120-1126.
- Cline, K., Ettinger, W. F. und Theg, S. M., (1992), Protein-Specific Energy Requirements for Protein Transport Across or into Thylakoid Membranes - Two Luminal Proteins are Transported in the Absence of ATP, *J. Biol. Chem.* 267 (4), 2688-2696.
- Cline, K., Fulsom, D. R. und Viitanen, P. V., (1989), An imported thylakoid protein accumulates in the stroma when insertion into thylakoids is inhibited, *J. Biol. Chem.* 264 (24), 14225-14232.
- Cline, K. und Henry, R., (1996), Import and routing of nucleus encoded chloroplast proteins, *Ann. Rev. Cell Develop. Biol.* 12, 1-26.
- Cline, K., Henry, R., Li, C. J. und Yuan, J. G., (1993), Multiple pathways for protein transport into or across the thylakoid membrane, *EMBO J.* 12 (11), 4105-4114.
- Connelly, J. P., Muller, M. G., Bassi, R., Croce, R. und Holzwarth, A. R., (1997), Femtosecond transient absorption study of carotenoid to chlorophyll energy transfer in the light harvesting complex II of photosystem II, *Biochemistry* 36 (2), 281-287.
- Croce, R. und Bassi, R., (1998), The Light-Harvesting Complex of Photosystem I: Pigment composition and Stoichiometry, *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (G. Garab ed.), Kluwer Academic Press, Netherlands, Vol. I 421-424,

- Croce, R., Remelli, R., Varotto, C., Breton, J. und Bassi, R., (1999), The neoxanthin binding site of the major light harvesting complex (LHCII), from higher plants, FEBS Lett. 456 (1), 1-6.
- Croce, R., Weiss, S. und Bassi, R., (1999), Carotenoid-binding sites of the major light-harvesting complex II of higher plants, J. Biol. Chem. 274 (42):29613-29623.
- Dalbey, R. E. und Robinson, C., (1999), Protein translocation into and across the bacterial plasma membrane and the plant thylakoid membrane, Trends Biochem. Sci. 24 (1), 17-22.
- Dawson, R. M. C., Elliott, D. C. Elliott W. H. und Jones, K. M., (1986), Data for Biochemical Research, Third Edition Oxford Science Publication, Oxford
- Day, D. A., Ryrie, I. J. und Fuad, N., (1984), Investigation of the Role of the Main Light-harvesting Chlorophyll-Protein Complex in Thylakoid Membranes. Reconstitution of Depleted Membranes from intermittent-light-grown plants with the isolated complex, J. Cell Biol. 97, 163-172.
- De Gier, J.-W., Scotti, P. A., Sääf, A., Valent, Q. A., Kuhn, A. und Lührink, J., (1998), Differential use of the signal recognition particle translocase targeting pathway for inner membrane protein assembly in Escherichia coli, PNAS. 95, 14646-14651.
- Dilly-Hartwig, H., Allen, J. F., Paulsen, H. und Race, H. L., (1998), Truncated recombinant light harvesting complex II proteins are substrates for a protein kinase associated with photosystem II core complexes, FEBS Lett. 435 (1), 101-104.
- 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. 106 (3), 841-848.
- Eads, D.D., Castner, E.W., Alberty, R.S., Mets, L. und Fleming, G.R. (1989) Direct observation of energy transfer in a photosynthetic membrane: chlorophyll b to chlorophyll a transfer in LHC, J. Phys. Chem. 93, 8272-8275.
- Eilers, M. und Schatz, G., (1986), Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria, Nature 322, 228-232.
- Endo, T., Kawakami, M., Goto, A., America, T., Weisbeek, P. und Nakai, M., (1994), Chloroplast protein import - Chloroplast envelopes and thylakoids have different abilities to unfold proteins, Eur. J. Biochem. 225 (1), 403-409.
- Fincher, V., McCaffery, M. und Cline, K., (1998), Evidence for a loop mechanism of protein transport by the thylakoid Delta pH pathway, FEBS Lett. 423 (1), 66-70.
- Folly, P. und Engel, N., (1999), Chlorophyll b to chlorophyll a conversion precedes chlorophyll degradation in Hordeum vulgare L., J Biol. Chem. 274 (31), 21811-21816.
- Franklin, A. E. und Hoffman, N. E., (1993), Characterization of a chloroplast homologue of the 54-kDa subunit of the signal recognition particle, J. Biol. Chem. 268 (29), 22175-22180.

- Gavel, Y., und von Heijne, G., (1992) The Distribution of Charged Amino Acids in Mitochondrial Inner Membrane Proteins Suggests Different Modes of Membrane Integration for Nuclearly and Mitochondrially Encoded Proteins. *Eur.J.Biochem.* 205, 1207-1215.
- Gavel, Y., Steppuhn, J., Herrmann, R. und Von Heijne, G., (1991), The Positive-Inside Rule Applies to Thylakoid Membrane Proteins, *FEBS Lett.* 282 (1), 41-46.
- Geiger, I., (1998), Grün fluoreszierendes Lichtsammelprotein: Fusionsproteine aus Green Fluorescent Protein (GFP), und dem Protein des Hauptlichtsammelproteins von PSII, Diplomarbeit.
- Giuffra, E., Zucchelli, G., Sandoná, D., Croce, R., Cugini, D., Garlaschi, F. M., Bassi, R. und Jennings, R. C., (1997), Analysis of some optical properties of a native and reconstituted photosystem II antenna complex, CP29: pigment binding sites can be occupied by chlorophyll a or chlorophyll b and determine spectral forms, *Biochemistry* 36 (42), 12984-12993.
- Griffin, B. A., Adams, S. R. und Tsien, R. Y., (1998), Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells, *Science* 281 (5374), 269-272.
- Grossman, A. R., Bhaya, D., Apt, K. E. und Kehoe, D. M., (1995), Light-harvesting complexes in oxygenic photosynthesis: Diversity, control, and evolution, *Ann. Rev. Genet.* 29, 231-288.
- Häder, D. P. und Häder M., (1993), *Moderne Labortechniken, Geräte und Methoden*, Thieme Verlag, Stuttgart,.
- Haehnel, W., Jansen, T., Gause, K., Klösigen, R. B., Stahl, B., Michl, D., Huvermann, B., Karas, M. und Herrmann, R. G., (1994), Electron transfer from plastocyanin to photosystem I, *EMBO-J* 13 (5), 1028-1038.
- Hartmann, E., Sommer, T., Prehn, S., Görlich D., Jentsch, S. und Rapoport, T. A., (1994), Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex, *Nature* 367, 654-657.
- He, M., Wilde, A. und Kaderbhai, M. A., (1989), A simple single-step procedure for small-scale preparation of *Escherichia coli* plasmids, *Nucl. Acids Res.* 18 (6), 1660.
- Heins, L. und Soll, J., (1998), Chloroplast biogenesis: Mixing the prokaryotic and the eukaryotic?, *Current-Biol.* 8 (6), R215-R217.
- Henry, R., Carrigan, M., Mccaffery, M., Ma, X. Y. und Cline, K., (1997), Targeting determinants and proposed evolutionary basis for the sec and the delta ph protein transport systems in chloroplast thylakoid membranes, *J. Cell Biol.* 136 (4), 823-832.
- Henry, R., Kapazoglou, A., Mccaffery, M. und Cline, K., (1994), Differences Between Lumen Targeting Domains of Chloroplast Transit Peptides Determine Pathway Specificity for Thylakoid Transport, *J. Biol. Chem.* 269 (14), 10189-10192.
- High, S., (1995), Protein translocation at the membrane of the endoplasmic reticulum, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 63 (2), 233-250.

- High, S., Henry, R., Mould, R. M., Valent, Q., Meacock, S., Cline, K., Gray, J. C. und Luirink, J., (1997), Chloroplast *srp54* interacts with a specific subset of thylakoid precursor proteins, *J. Biol. Chem.* 272 (17), 11622-11628.
- Hobe, S., (1995), Trimerisierung des in-vitro-rekonstituierten Lichtsammelkomplexes höherer Pflanzen und spektroskopische Untersuchungen zur Pigmentorganisation, M Wissenschaftsverlag Mainz, Aachen,
- Hobe, S., Förster, R., Klingler, J. und Paulsen, H., (1995), N-proximal sequence motif in light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein is essential for the trimerization of light-harvesting chlorophyll *a/b* complex, *Biochemistry* 34 (32), 10224-10228.
- Hobe, S., Kuttkat, A., Förster, R. und Paulsen, H., (1996), Assembly of trimeric light-harvesting chlorophyll *a/b* complex in vitro, in: *Photosynthesis: From Light to Biosphere* (Mathis, P., eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 47-52,
- Hobe, S., Prytulla, S., Kühlbrandt, W. und Paulsen, H., (1994), Trimerization and crystallization of reconstituted light-harvesting chlorophyll *a/b* complex, *EMBO J.* 13 (15), 3423-3429.
- Hochuli, E., Döbeli, H. und Schacher, A., (1987), New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighboring Histidine residues, *J. Chromatography.* 411, 177-184.
- Hoffman, N. E. und Franklin, A. E., (1994), Evidence for a stromal GTP requirement for the integration of a chlorophyll *a/b*-binding polypeptide into thylakoid membranes, *Plant Physiol.* 105 (1), 295-304.
- Hoober, J. K., White, R. A., Marks, D. B. und Gabriel, J. L., (1994), Biogenesis of thylakoid membranes with emphasis on the process in *Chlamydomonas*, *Photosynth. Res.* 39 (1), 15-31.
- Hulford, A., Hazell, L., Mould, R. M. und Robinson, C., (1994), Two distinct mechanisms for the translocation of proteins across the thylakoid membrane, one requiring the presence of a stromal protein factor and nucleotide triphosphates, *J. Biol. Chem.* 269 (5), 3251-3256.
- Hynds, P. J., Robinson, D. und Robinson, C., (1998), The Sec-independent twin-arginine translocation system can transport both tightly folded and malformed proteins across the thylakoid membrane, *J. Biol. Chem.* 273 (52), 34868-34874.
- Jahns, P. und Junge, W., (1993), Another role of chlorophyll-*a/b* binding proteins of higher plants - They modulate protolytic reactions associated with photosystem II, *Photochem. Photobiol.* 57 (1), 120-124.
- James, H. E., Bartling, D., Musgrove, J. E., Kirwin, P. M., Herrmann, R. G., and Robinson, C., (1989), Transport of proteins into chloroplasts: import and maturation of precursors to the 33-, 23-, and 16-kDa proteins of the oxygen evolving complex., *J. Biol. Chem.* 264, 19573-19576.
- Jansson, S., (1994), The light-harvesting chlorophyll *a/b* binding proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1184 (1), 1-19.

- Jansson, S., Andersen, B. und Scheller, H. V., (1996), Nearest-neighbor analysis of higher-plant photosystem I holocomplex, *Plant Physiol* 112 (1), 409-420.
- Jones, P., Qiu, J. und Rickwood, D., (1994) *RNA, Isolation and Analysis*; Bios Scientific Publishers Ltd.
- Karnauchov, I., Cai, D. G., Schmidt, I., Herrmann, R. G. und Klösgen, R. B., (1994), The thylakoid translocation of subunit 3 of photosystem I, the *psaF* gene product, depends on a bipartite transit peptide and proceeds along an azide-sensitive pathway, *J. Biol. Chem.* 269 (52), 32871-32878.
- Kessler, F., Blobel, G., Patel, H. A. und Schnell, D. J., (1994), Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast protein import machinery, *Science* 266 (5187), 1035-1039.
- Kim, S. J., Robinson, C. und Mant, A., (1998), Sec/SRP-independent insertion of two thylakoid membrane proteins bearing cleavable signal peptides, *FEBS Lett.* 424 (1-2), 105-108.
- Kirby, K. S. (1956) A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues *Biochem J.* 64, 405
- Klimyuk, V. I., Persello-Cartieaux, F., Havaux, M., Contard-David, P., Schuenemann, D., Meierhoff, K., Jones, J. D., Hoffman N. E. und Nussaume, L., (1999), A chromodomain protein encoded by the *Arabidopsis* CAO gene is a plant-specific component of the chloroplast Signal Recognition Particle pathway that is involved in LHCP targeting, *Plant Cell* 11, 87-99.
- Klösgen, R. B., (1997), Protein transport into and across the thylakoid membrane, *Photochem. Photobiol.* 38 (1), 1-9.
- Klösgen, R. B., Brock, I. W., Herrmann, R. G. und Robinson, C., (1992), Proton Gradient-Driven Import of the 16 kDa Oxygen-Evolving Complex Protein as the Full Precursor Protein by Isolated Thylakoids, *Plant Mol. Biol.* 18 (5), 1031-1034.
- Kogata, N., Nishio, K., Hirohashi, T., Kikuchi, S. und Nakai, M. (1999), Involvement of a chloroplast homologue of the signal recognition particle receptor protein, *FtsY*, in protein targeting to thylakoids, *FEBS Lett.* 447 (2-3), 329-333.
- Kohorn, B. D., Harel, E., Chitnis, P. R., Thornber, J. P. und Tobin, E. M. (1986), Functional and mutational analysis of the light-harvesting chlorophyll a/b protein of thylakoid membranes, *J. Cell Biol.* 102, 972-981.
- Kohorn, B. D. und Tobin, E. M., (1989), A Hydrophobic, Carboxy-Proximal Region of a Light-Harvesting Chlorophyll a/b Protein is Necessary for Stable Integration into Thylakoid Membranes, *Plant Cell*, 159-166.
- Kropat, J., Oster, U., Rudiger, W. und Beck, C. F., (1997), Chlorophyll precursors are signals of chloroplast origin involved in light induction of nuclear heat-shock genes, *PNAS* 94 (25), 14168-14172.
- Kruip, J., Bald, D., Boekema, E. und Rogner, M., (1994), Evidence for the existence of trimeric and monomeric Photosystem I complexes in thylakoid membranes from cyanobacteria, *Photosynth. Res.* 40 (3), 279-286.

- Krupa, Z., Williams, J. P., Khan, M. U. und Huner, N. P. A., (1992), The role of acyl lipids in reconstitution of lipid-depleted light-harvesting complex-II from cold-hardened and nonhardened rye, *Plant Physiol.* 100 (2), 931-938.
- Kühlbrandt, W., Wang, D. N. und Fujiyoshi, Y., (1994), Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography, *Nature* 367 (6464), 614-621.
- Kuhn, M., Fromme, P. und Krabben, L., (1994), A "membrane-attached" alpha-helix: a conserved structural motif in bacterial reaction centres, photosystem I and chloroplast NADH-plastoquinone oxidoreductase., *Trends Biochem. Sci.* 19, 401-402.
- Kuttkat, A., Edhofer, I., Eichacker, L. A. und Paulsen, H., (1997), Light harvesting chlorophyll a/b binding protein stably inserts into etioplast membranes supplemented with Zn pheophytin a/b, *J. Biol. Chem.* 272 (33), 20451-20455.
- Kuttkat, A., Grimm, R. und Paulsen, H., (1995), Light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein inserted into isolated thylakoids binds pigments and is assembled into trimeric light-harvesting complex, *Plant Physiol.* 109 (4), 1267-1276.
- Kuttkat, A., Hartmann, A., Hobe, S. und 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, *EJB* 242 (2), 288-292.
- Kuttkat, A., (1997), Untersuchungen zur Insertion und Assemblierung des Chlorophyll a/b-bindenden Lichtsammelproteins an isolierten Thylakoidmembranen höherer Pflanzen, *Dissertationsverlag NG Kopierladen GmbH, München*,
- Laemmli, U. K., (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.
- Laidler, V., Chaddock, A. M., Knott, T. G., Walker, D. und Robinson, C., (1995), A SecY homolog in *Arabidopsis thaliana* - Sequence of a full-length cDNA clone and import of the precursor protein into chloroplasts, *J. Biol. Chem.* 270 (30), 17664-17667.
- Lee, A. L. C. und Thornber, J. P., (1995), Analysis of the pigment stoichiometry of pigment-protein complexes from barley (*Hordeum vulgare*), - The xanthophyll cycle intermediates occur mainly in the light-harvesting complexes of photosystem I and photosystem II, *Plant Physiol.* 107 (2), 565-574.
- Lemmon, M. A., MacKenzie, K. R., Arklin, I. T. und Engelman, D. M., (1997), Transmembrane helix interactions in folding and oligomerization of integral membrane proteins, in: *Membrane Protein Assembly* (von Heijne, G., eds), R.G. Landes Company, Austin, Texas, USA, pp 3-23,
- Li, X. X., Henry, R., Yuan, J. G., Cline, K. und Hoffman, N. E., (1995), A chloroplast homologue of the signal recognition particle subunit SRP54 is involved in the posttranslational integration of a protein into thylakoid membranes, *PNAS* 92 (9), 3789-3793.
- Lippard, S. J. und Berg, J. M., (1994), *Principles of Bioinorganic Chemistry*, Mill Valley, CA.,

- Mant, A. und Robinson, C., (1998), An Arabidopsis cDNA encodes an apparent polyprotein of two non-identical thylakoid membrane proteins that are associated with photosystem II and homologous to algal ycf32 open reading frames, FEBS Lett. 423 (2), 183-188.
- Marrs, K. A. und Kauffman, L. S., (1989), Blue light regulation of transcription for nuclear genes in pea, PNAS 86, 4492-4495.
- Meehan, L., Harkins, K., Chory, J. und Rodermel, S., (1996), Lhcb transcription is coordinated with cell size and chlorophyll accumulation - Studies on fluorescence-activated, cell-sorter-purified single cells from wild-type and immutans Arabidopsis thaliana, Plant Physiol. 112 (3), 953-963.
- Merchant, S. und Dreyfuss, B. W., (1998), Posttranslational assembly of photosynthetic metalloproteins, Ann. Rev. Plant Physiol. 49 , 25-51.
- Merril, C. R., Goldmann, D., Sedman, S. A. und Ebert, M. H., (1991), Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins, Science 211, 1437-1438.
- Michl, D., Robinson, C., Shackleton, J. B., Herrmann, R. G. und Klösken, R. B., (1994), Targeting of proteins to the thylakoids by bipartite presequences - CFoII is imported by a novel, third pathway, EMBO J. 13 (6), 1310-1317.
- Mori, H., Summer, E. J., Ma, X. Y. und Cline, K., (1999), Component specificity for the thylakoidal Sec and Delta pH-dependent protein transport pathways, J. Cell Biol. 146 (1), 45-55.
- Mothes, W., Prehn, S. und Rapoport, T.A., (1994) Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane, EMBO J. 13, 3973-3982.
- Mould, R. M. und Robinson, C., (1991), A Proton Gradient Is Required for the Transport of Two Lumenal Oxygen-Evolving Proteins Across the Thylakoid Membrane, J. Biol. Chem. 266 (19), 12189-12193.
- Nakatani, H. Y., Barber, J. und Minski, M. J., (1979), The influence of the thylakoid membrane surface properties on the distribution of ions in chloroplasts, Biochim. Biophys. Acta. 545, 24-35.
- Nakai, M., Goto, A., Nohara, T., Sugita, D. und Endo, T., (1994), Identification of the SecA protein homolog in pea chloroplasts and its possible involvement in thylakoidal protein transport, J. Biol. Chem. 269 (50), 31338-31341.
- Neupert, W., (1997), Protein import into mitochondria, Ann. Rev. Biochem., 66 863-917.
- Nielsen, V. S., Mant, A., Knoetzel, J., Moller, B. L. und 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 (5), 3762-3766.
- Nilsson, R., Brunner, J., Hoffman, N. E. und van Wijk, K. J., (1999), Interactions of ribosome nascent chain complexes of the chloroplast-encoded D1 thylakoid membrane protein with cpSRP54, EMBO J. 18 (3), 733-742.

- 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 (2), 347-356.
- Påsson, L. O., Spangfort, M. D., Gulbinas, V. und Gillbro, T., (1994), Ultrafast chlorophyll b chlorophyll a excitation energy transfer in the isolated light harvesting complex, LHC II, of green plants - implications for the organisation of chlorophylls, *FEBS Lett.* 339 (1-2), 134-138.
- Park, H. und Hooper, J. K., (1997), Chlorophyll synthesis modulates retention of apoproteins of light-harvesting complex II by the chloroplast in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Physiol. Plant.* 101 (1), 135-142.
- Paulsen, H., Finkenzeller, B. und Kühlein, N., (1993), Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein, *Eur. J. Biochem.* 215 (3), 809-816.
- Paulsen, H. und 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.* 57 (1), 139-142.
- Paulsen, H., Rümmler, U. und Rüdiger, W., (1990), Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein overexpressed in *E. coli*, *Planta* 181, 204-211 .
- Payan, L. A. und Cline, K., (1991), A stromal protein factor maintains the solubility and insertion competence of an imported thylakoid membrane protein, *J. Cell Biol.* 112 (4), 603-613.
- Pesaresi, P., Sandoña, D., Giuffra, E. und Bassi, R., (1997), A single point mutation (E166Q), prevents dicyclohexylcarbodiimide binding to the photosystem II subunit CP29, *FEBS Lett.* 402 (2-3), 151-156.
- Peter, G. F. und Thornber, J. P., (1991), Electrophoretic procedures for fractionation of photosystems I and II pigment proteins of higher plants and for determination of their subunit composition, *Methods in Plant Biochemistry* (Rogers, L. G., eds.), Academic Press, New York, 195-210,
- Pilgrim, M. L., vanWijk, K. J., Parry, D. H., Sy, D. A. C. und Hoffman, N. E., (1998), Expression of a dominant negative form of cpSRP54 inhibits chloroplast biogenesis in *Arabidopsis*, *Plant Journal* 13 (2), 177-186.
- Plumley, F. G. und Schmidt, G. W., (1987), Reconstitution of chlorophyll a/b light-harvesting complexes: Xanthophyll-dependent assembly and energy transfer, *PNAS* 84, 146-150.
- Porath J. und Ohlin B., (1983), Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions, *Biochemistry* 22, 1621-1630.
- Porra, R. J., Thompson, W. A. und 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.

- Pugsley, A. P., (1993), The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria, *Microbiol. Rev.* 57, 50-108.
- Rapoport, T. A., Jungnickel, B. und Kutay, U., (1996), Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes, *Ann. Rev. Biochem.* 65, 271-303.
- Reed, J. E., Cline, K., Stephens, L. C., Bacot, K. O. und Viitanen, P. V., (1990), Early events in the import assembly pathway of an integral thylakoid protein, *Eur. J. Biochem.* 194 (1), 33-42.
- Reinbothe, S. und Reinbothe, C., (1996), Regulation of chlorophyll biosynthesis in angiosperms, *Plant Physiol* 111 (1), 1-7.
- Remelli, R., Varotto, C., Sandona, D., Croce, R., and Bassi, R., (1999), , *J. Biol. Chem.* 274 (47), 33510-33521.
- Reumann, S., Davila-Aponte, J. und Keegstra, K., (1999), The evolutionary origin of the protein-translocating channel of chloroplastic envelope membranes: identification of a cyanobacterial homolog, *PNAS* 96 (2) 784-789.
- Reumann, S. und Keegstra, K., (1999), The endosymbiotic origin of the protein import machinery of chloroplastic envelope membranes, *Trends in Plant Science* 4 (8), 302-307 .
- Richter, S. und Lamppa, G. K., (1998), A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase, *PNAS* 95 (13), 7463-7468.
- Robinson, C., Cai D., Hulford A., Brock I. W., Michl D., Hazell L., Schmidt-I., Herrmann R.G. und Klös gen R.B., (1994), The presequence of a chimeric construct dictates which of two mechanisms are utilized for translocation across the thylakoid membrane: evidence for the existence of two distinct translocation systems, *EMBO J.* 13 (2), 279-285.
- Robinson, C., Hynds, P. J., Robinson, D. und Mant, A., (1998), Multiple pathways for the targeting of thylakoid proteins in chloroplasts, *Plant Mol. Biol.* 38 (1-2), 209-221.
- Robinson, D., Karnauchov, I., Herrmann, R. G., Klös gen, R. B. und Robinson, C., (1996), Protease-sensitive thylakoidal import machinery for the Sec-, Delta pH- and Signal Recognition Particle-dependent protein targeting pathways, but not for CFoII integration, *Plant Journal* 10 (1), 149-155.
- Rogl, H. und Kühlbrandt W., (1999), Mutant trimers of light harvesting complex II show altered pigment content and spectroscopic features, *Biochemistry*, in press.
- Rogl, H., Kosemund, K., Kühlbrandt, W. und Collinson, I., (1998), Refolding of *Escherichia coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography, *FEBS Lett.* 432 (1-2), 21-26.
- Rothen, R., Thiess, M., Schumann, P. und Boschetti, A., (1996), Import inhibition of poly(His), containing chloroplast precursor proteins by Ni²⁺ ions, *FEBS Lett.* 396 (2-3), 135-138.
- Sambrook, J., Fritsch E. F. und Maniatis, T., (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York,

- Sandoná, D., Croce, R., Pagano, A., Crimi, M. und Bassi, R., (1998), Higher plants light harvesting proteins. Structure and function as revealed by mutation analysis of either protein or chromophore moieties, *Biochim. Biophys. Acta* 1365 (1-2), 207-214.
- Santini-CL, Ize-B, Chanal-A, Muller-M, Giordano-G, und Wu-LF, (1998), A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*, *EMBO J.* 17(1), 101-112.
- Schmid, V. und Schäfer, C., (1994), Alterations of the chlorophyll-protein pattern in chronically photoinhibited *Chenopodium rubrum* cells, *Planta* 192 (4), 473-479.
- Schmid, V. H. R., Cammarata, K. V., Bruns, B. U. und Schmidt, G. W., (1997), In vitro reconstitution of the photosystem I light harvesting complex LHCI 730: Heterodimerization is required for antenna pigment organization, *PNAS* 94 (14), 7667-7672.
- Schnell, D. J., (1998), Protein targeting to the thylakoid membrane, *Ann. Rev. Plant-Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 97-126.
- Schnell, D. J. und Blobel, G., (1993), Identification of Intermediates in the Pathway of Protein Import into Chloroplasts and their Localization to Envelope Contact Sites, *J. Cell Biol.* 120 (1), 103-115.
- Schuenemann, D., Amin, P. und Hoffman, N. E., (1999), Functional divergence of the plastid and cytosolic forms of the 54-kDa subunit of signal recognition particle, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 254 (1), 253-258.
- Schuenemann, D., Gupta, S., Persello-Cartieaux, F., Klimyuk, V. I., Jones, J. D. G., Nussaume, L. und Hoffman, N. E., (1998), A novel signal recognition particle targets light-harvesting proteins to the thylakoid membranes, *PNAS* 95 (17), 10312-10316.
- Scopes, R. K., (1994), Protein purification, principles and practice, Springer Verlag, Berlin/Heidelberg,
- Seidler, A. und Michel, H., (1990), Expression in *Escherichia coli* of the psbO gene encoding the 33 kD protein of the oxygen-evolving complex from spinach , *EMBO J.* 9, 1743-1748.
- Settles, A. M. und Martienssen, R., (1998), Old and new pathways of protein export in chloroplasts and bacteria, *Trends-In-Cell-Biology. Trends Cell Biol.* 8 (12), 494-501.
- Settles A. M., Yonetani A., Baron A., Bush D. R , Cline K., und Martienssen R., (1997), Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein, *Science* 278 (5342), 1467-1470 .
- Spiess-M, (1995), Heads or tails-what determines the orientation of proteins in the membrane, *FEBS Lett.* 369 (1), 76-79.
- Stys, D., (1995), Stacking and separation of photosystem I and photosystem II in plant thylakoid membranes: A physico-chemical view, *Physiol. Plant.* 95 (4), 651-657.
- Sulli, C., Fang Z.W., Muchal, U. und Schwartzbach, S. D., (199), Topology of *Euglena* Chloroplast protein precursors within Endoplasmatic Reticulum to Golgi to Chloroplast transport vesicles, *J. Biol. Chem.* 274 (1), 457-463.

- Sulli, C. und Schwartzbach, S. D. (2 1995), The polypeptide precursor to the Euglena light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein is transported to the Golgi apparatus prior to chloroplast import and polypeptide processing, *J. Biol. Chem.* 270 (22), 13084-13090.
- Taylor, W. C., (1989), Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 211-233.
- Theg, S. M. und Scott, S. V., (1993), Protein import into chloroplasts, *Trends Cell Biol* 3, 186-190.
- Thompson, S. J., Kim, S. J. und Robinson C., (1998), Sec-independent Insertion of Thylakoid Membrane Proteins. Analysis of insertion forces and identification of a loop intermediate involving the signal peptide, *J. Biol. Chem* 273, 18979-18983.
- Thompson, S. J., Robinson, C. und Mant, A., (1999), Dual signal peptides mediate the signal recognition particle/Sec-independent insertion of a thylakoid membrane polypeptide, *PsbY*, *J. Biol. Chem* 274 (7), (4059-4066).
- Thompson, W. F. und White, M. J., (1991), Physiological and Molecular Studies of Light-Regulated Nuclear Genes in Higher Plants, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 42, 423-466.
- Tu, C.-J., Schuenemann, D. und Hoffman, N. E., (1999), Chloroplast FtsY, chloroplast signal recognition particle, and GTP are required to reconstitute the soluble phase of light-harvesting chlorophyll protein transport into thylakoid membranes, *J. Biol. Chem.* 274 (38), 27219-27224.
- Tzinis, G., Argyroudi-Akoyunoglou, J. H. und Akoyunoglou, G., (1987), The effect of the dark interval in intermittent light on thylakoid development: photosynthetic unit formation and light harvesting protein accumulation, *Photosynth. Res.* 144 (251-258).
- Voelker, R. und Barkan, A., (1995), Two nuclear mutations disrupt distinct pathways for targeting proteins to the chloroplast thylakoid, *EMBO J.* 14 (16), 3905-3914.
- Voelker-R, Mendel-Hartvig-J, und Barkan-A, (1997), Transposon-disruption of a maize nuclear gene, *tha1*, encoding a chloroplast SecA homologue: in vivo role of cp-SecA in thylakoid protein targeting, *Genetics* 145 (2), 467-478.
- Von Heijne, G., (1987), *Sequence Analysis in Molecular biology: Treasure Trove or Trivial Pursuit ?*, Academic Press, New York
- Von Heijne, G. und Nishikawa, K., (1991), Chloroplast transit peptides. The perfect random coil?, *FEBS Lett.* 278, 1-3.
- Walter-P und Johnson-A. E., (1994), Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane, *Ann. Rev. Cell Biol.* 10, 87-119.
- Weiner, J. H., Bilous, P. T., Shaw, G. M., Lubitz, S. P., Frost, L., Thomas, G. H., Cole, J. A. und Turner, R. J., (1998), A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins, *Cell* 93 (1), 93-101.
- Westermeier, R., (1990), *Elektrophorese-Praktikum*, VCH, Weinheim,

- White, R. A., Wolfe, G. R., Komine, Y. und Hooper, J. K., (1996), Localization of light-harvesting complex apoproteins in the chloroplast and cytoplasm during greening of *Chlamydomonas reinhardtii* at 38 °C, *Photosynth. Res.* 47 (3), 267-280.
- Williams, R. S., Allen, J. F., Brain, A. P. R. und Ellis, R. J., (1987), Effect of Mg²⁺ on excitation energy transfer between LHC II and LHC I in a chlorophyll-protein complex, *FEBS Lett.* 225 (1,2), 59-66.
- Wolfe, G. R., Park, H., Sharp, W. P. und Hooper, J. K., (1997), Light harvesting complex apoproteins in cytoplasmic vacuoles in *Chlamydomonas reinhardtii* (chlorophyta), *J. Phycol.* 33 (3), 377-386.
- Yoshihisa, T. und Ito, K., (1996), Pro-OmpA derivatives with a His(6) tag in their N-terminal "translocation initiation domains" are arrested by Ni²⁺ at an early post-targeting stage of translocation, *J. Biol. Chem.* 271 (16), 9429-9436.
- Yuan, J. G., Henry, R., McCaffery, M. und Cline, K., (1994), SecA homolog in protein transport within chloroplasts: Evidence for endosymbiont-derived sorting, *Science* 266 (5186), 796-798.
- Yang, C., Kosemund, K., Cornet, C. and Paulsen, H. (1999) Exchange of pigment-binding amino acids in light-harvesting chlorophyll a/b protein, *Biochemistry*. in press

Klonierungsschritte für die Klone C2.4h und C2.4Eh:DNA-Sequenz des Ausgangsklons (1n.1):

F V P G K
5' TTT GTT CCC GGA AAA TAA ACA CTC 3' (1n.1)

DNA-Sequenz des "Zwischen"-Klons (C1.1Xma):

F V P G K
5' TTT GTT CCC GGG AAA TAA ACA CTC 3'

Verwendete Primer zur Generation des "Zwischen"-Klons (C1.1Xma):

Orientierung:	Name:	Sequenz:
antisense:	S1	5' GATGGAGTTCTGAGG 3'
sense:	782+	5' GGTGGAAGCTTTGATCC 3'
Mutageneseprimer, sense	SMA984+	5' CCCGGGAAATAAACACTC 3'

Schnittstelle des "Zwischen"-Klons C1.1Xma:

Neue Restriktionsstelle an Position 799-804, Enzym: *XmaI*

F V G K
5' TTT GTT C CC GGG AAA TAA ACA CTC 3' (C1.1Xma)
3' AAA CAA GGG CC C TTT ATT TGT GAG..5'

Äußere Schnittstellen für die Ligation von Insert und Vektor: *PstI* und *BclI*DNA-Sequenzen der Oligonukleotide für die Klone C2.4h und C2.4Eh:C2.4h:

5' CC GGA AAA CAC CAT CAC CAT CAC CAT TAA C 3' C-hisse
3' T TTT GTG GTA GTG GTA GTG GTA ATT GGG CC 5' C-hisan

C2.4Eh:

5' CC GGA AGA GGA TCC CAC CAT CAC CAT CAC CAT TAA C 3' C-Ehisse
3' T TCT CCT AGG GTG GTA GTG GTA GTG GTA ATT GGG CC 5' C-Ehisan

DNA-Sequenz der "neuen" Klone:C2.4h:

5' TTT GTT CCC GGA AAA CAC CAT CAC CAT CAC CAT TAA CCC GGG TAA ACA CTC GGG AAA TAA 3'
3' AAA CAA GGG CCT TTT GTG GTA GTG GTA GTG GTA ATT GGG CCC ATT TGA GAG CCC TTT ATT 5'

C2.4Eh:

5' TTT GTT CCC GGA AGA GGA TCC CAC CAT CAC CAT CAC CAT TAA CCC GGG TAA ACA CTC GGG AAA TAA
3' AAA CAA GGG CCT TCT CCT AGG GTG GTA GTG GTA GTG GTA ATT GGG CCC ATT TGA GAG CCC TTT ATT 5'

Weitere Änderung an C1.1Xma durch *PstI* Verdau von Klon 1n.1:1n.1.

AB80 Blueskript pDS 12/RBS II
PstI EcoRI SalI PstI HindIII
952
5'...TAA...TTTGGGCTGAGGAATTGGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTGAGCCCAAGCTT.3'..

Deletion (nach *PstI*-Verdau):

C1.1Xma pDS 12/RBS II
PstI HindIII
5'...TAA...TTTGGGCTGAGCCCAAGCTT.3'

Klonierungsschritte für den Klon D7AH2:DNA-Sequenz des Ausgangsklons (C3.2h):

A G G P L
5' GCC GGT GGG CCT CTC 3'

DNA-Sequenz des "Zwischen"-Klons (D7ApaI3):

A G G P L
5' GCC GGT GGG CCC CTC 3'

Verwendete Primer zur Generation des "Zwischen"-Klons (D7ApaI3):

Orientierung:	Name:	Sequenz:
sense:	S2:	5' CGGTGACTACGGTTGGG 3'
antisense:	C-hisan:	3' TTTTGTGGTAGTGGTAGTGGTAATTGGGCC 5'
Mutageneseprimer, antisense,	mut552ApaI:	5' CACCGAGGGGCCAC 3'

(Vektor in SCS 110-Zellen wegen *dam*-Methylierungs-Sensitivität)

Schnittstelle des "Zwischen"-Klons D7ApaI3:Neue Restriktionsschnittstelle an Position 547-552, Enzym: *ApaI*

	A	G	G		L	
5'	GCC	GGT	GGG	CC	C CTC	3' (D7ApaI3)
3'	CGG	CCA	C		CC GGG GAG	5'

Äußere Schnittstellen für die Ligation von Insert und Vektor: *BstEII* und *BclI*DNA-Sequenzen der Oligonukleotide für D7AH2:

5'		T	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	GGG	CC	3' ApaHis+
3'	CC	GGA	GTG	GTA	GTG	GTA	GTG	GTA	C		5' ApaHis-

DNA-Sequenz des neuen Klons D7AH2:

5'	GCC	GGT	GGG	CCT	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	GGG	CCC	CTC	3'
3'	CGG	CCA	CCC	GGA	GTG	GTA	GTG	GTA	GTG	GTA	CCC	GGG	GAG	5'

Klonierungsschritte für den Klon D7PH11:DNA-Sequenz des Ausgangsklons C3.2h:

	G	L	S	A	D
5'	GGA	CTC	TCT	GCT	GAC C 3'

DNA-Sequenz des "Zwischen"-Klons D7PvuII

	G	L	S	A	D
5'	GGA	CTC	TCA	GCT	GAC C 3' (D7ApaI3)

Verwendete Primer zur Generation des "Zwischen"-Klons D7PvuII2:

Orientierung:	Name:	Sequenz:
sense:	DS23+:	5' ATTTGCTTTGTGAGCGG 3'
antisense:	C-hisan:	3' TTTTGTGGTAGTGGTAGTGGTAATTGGGCC 5'
Mutageneseprimer, antisense, mut267PvuII-: 5' GGTCAGCTGAGAGTCC 3'		

Schnittstelle des Zwischenklons D7PvuII2:neue Restriktionsstelle: Position 266 – 271, Enzym(e): *PvuII*

G	L	S		D
5'	GGA	CTC	TCA	G CT GAC 3' (C3.2h)
3'	CCT	GAG	AGT	C GA CTG 5'

Äußere Schnittstellen für die Ligation von Insert und Vektor: *EcoRI* und *BstEII*DNA-Sequenzen der Oligonukleotide für D7PH11:

5'	CG	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	G 3' PvuIIHis+
3'	GC	GTG	GTA	GTG	GTA	GTG	GTA	C 5' PvuIIHis-

DNA-Sequenz des neuen Klons D7PH11:

5'	GGA	CTC	TCA	GCG	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	GCT	GAC 3' (D7PvuII2)
3'	CCT	GAG	AGT	CGC	GTG	GTA	GTG	GTA	GTG	GTA	CGA	CTG 5'

Amp	Ampicillin	LDS	lithium dodecyl sulfate
AP	Alkalische Phosphatase	LHC	Lichtsammelkomplex
APS	Ammoniumperoxidsulfat	Lhc	Lichtsammelprotein
ATP	Adenosintriphosphat	MV	Methylviologen
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat	MW	Molekulargewicht
β-ME	β-Mercaptoethanol	NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
BSA	bovine serum albumine	NTA	nitrilotriaceticacid
cab	Chlorophyll <i>a/b</i>	NTP	Nukleosidtriphosphat
cab	Chlorophyll <i>a/b</i> bindend	OD	Optische Dichte
Chl	Chlorophyll	OEC	oxygen evolving complex
Ci	Curie	OG	Octylglycosid
CIP	calf intestinal phosphatase	PAA	Polyacrylamid
CMC	critical micellar concentration	PCR	polymerase chain reaction
cp	Chloroplast	pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
cpm	counts per minute	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
DM	Decylmaltosid	PNK	Polynukleotid-Kinase
DNA	deoxyribonucleic acid	PS	Photosystem
DNase	Desoxyribonuklease	rpm	rounds per minute
dpm	desintegrations per minute	RT	Raumtemperatur
DTT	Dithiothreitol	SDS	sodium dodecyl sulfate
<i>E.coli</i>	Escherichia coli	Sec	secretion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SRP	signal recognition particle
GFP	Green Fluorescent Protein	TBS	Tris buffered saline
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure	TE	Tris-EDTA
His	Histidin	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
IMA	immobilized metal affinity	Tris	N-(hydroxymethyl)-amino-methan
IPTG	Isopropylthiogalaktosid	üN	über Nacht
kDa	Kilodalton	UZ	Ultrazentrifuge